

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
UNIVERSITE DE LIEGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

**“Évaluation de l’impact de l’extrapolation de bioréacteur  
sur la physiologie de *Yarrowia lipolytica* pour la production  
de lipase”**

**Tambi KAR**

Dissertation originale présentée en vue de l’obtention du grade  
de Docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs: Pr. Philippe THONART

Pr. Frank DELVIGNE

**2011**

*Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et de des modifications ultérieures.*

## *Dédicace*

*A Houda, mon épouse. Ce travail te doit beaucoup. Qu'il soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de durs labeurs, de compréhensions et de tolérances, de privations et d'efforts communs. Tu as vécu avec moi dans ces années les moments les plus difficiles dans notre vie. Tu m'as supporté beaucoup, je peux te dire que sans toi je ne peux pas arriver jusque là. Merci mon cœur.*

*A notre fille Sarah, ta naissance vient comme un cadeau de Dieu pour couronner cette thèse.*

*A mon père, qui me disait un jour « un diplôme de doctorat t'assure un bon vie pour l'avenir », trouve ici la réalisation de tes vœux, mon immense reconnaissance.*

*A ma mère pour l'absence prolongée de son fils et la peine endurée.*

*A mes frères Louay et Ayman, qui me manquent toute la période de mon doctorant et J'ai été privé de l'assistance de ses mariages.*

## Remerciements

*La réalisation de cette thèse fut une occasion merveilleuse de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes. Je ne saurais pas les citer toutes sans dépasser le nombre de pages raisonnablement admis dans ce genre de travail. Il me tient à cœur de remercier tous ceux qui y ont contribué de près ou de loin.*

*Je pense particulièrement à Monsieur le Professeur Philippe THONART, mon promoteur, pour la finesse de ses attitudes sur le plan aussi bien humain que scientifique. Grâce à son approche respectueuse de la personne humaine, je me suis continuellement senti à l'aise. Je lui en sais infiniment gré.*

*Je remercie très sincèrement Monsieur Frank DELVIGNE co-promoteur, Ses remarques successives ont permis d'améliorer les différentes versions de ce travail. Il a toujours trouvé comme un chef les mots justes et un soutien total et sans faille dans les moments délicats. pour avoir lu ce travail et pour m'avoir continuellement donner des conseils très avisés dans la rédaction des différents articles scientifiques de cette thèse.*

*Je tiens à adresser ma gratitude aux membres du jury, en particulier à Madame le Professeur Jaqueline DESTAIN, aux Messieurs les Professeurs Frédéric LEBEAU, Georges LOGNAY, François BERA, Marianne SINDIC pour leur disponibilité.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Patrick FICKERS et au Professeur Galleni MORENO pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.*

*Mes remerciements s'adressent également à tout le personnel de la Salle de fermenteur en occurrence Monsieur Samuel TELEK pour son aide, ses conseils et sa disponibilité. Ce fut très agréable de travailler avec toi.*

*Je tiens à remercier particulièrement le personnel du secrétariat du CWBI, que je nomme affectueusement la « tour de contrôle du CWBI », Marina CHANET, Marguerite DEMI pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité et surtout leur bonne humeur qui n'a jamais fait défaut tout au long de ces années.*

*Je tiens ici à remercier tout le personnel scientifique et technique qui œuvre chaque jour pour la renommée du CWBI, en particulier aux Madame le Docteur Jacqueline DESTAIN, Marc OGENA, Martine ALLGAERT, Annick SALVE, Cathy HELWUS, Pascale VANHAL, , Thami el MEJDOUB, Annick LEJEUNE, Danielle DUBALLET, Fabienne PISCART, Christophe THIRY, Benoît MASSAUX, Laurent Frederick, Céline PIERART, Mathias HISSETTE pour leur aide et leur amitié et surtout leur compréhension pour ces années formidables passées ensemble.*

*Mes cinq années d'études au CWBI, se sont déroulées dans un environnement convivial, c'est pourquoi je tiens à remercier tous les doctorants avec lesquels j'ai passé ces journées au CWBI à l'unité de Bio-industries de Gembloux: Ibrahim HAMADI, Charles YAPO, Michel MUSONI, Alison BROGNAUX, Khady BA, Roland FOMA, Hélène CAWOY, Ibourahemea Coulibaly, Cédric TARAYRE, François LYUMUGABE, Jean-Noël MPUUTU, Eugène KARENZI, Venant NIHORIMERE, Guillaume HENRY pour leur marque de sympathie et leur amitié sans faille durant cette période.*

*Enfin, je voudrais dire un grand merci à mon épouse Houda KHAMIS pour sa patience, à notre fille, ainsi qu'à mes parents et aux familles proches pour leur soutien de tout temps.*

***Que toutes les personnes que j'ai oublié de citer trouvent dans ce dernier paragraphe mes sincères reconnaissances et mes remerciements distingués.***

***Tambi***

**Tambi KAR (2011)** Evaluation de l'impact de l'extrapolation des bioréacteurs sur la physiologie de *Yarrowia lipolytica* pour la production de lipase (thèse de doctorat en français) ; Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, (Belgique), 130 p., 42 figures.

## Résumé

---

Les travaux entrepris au cours de cette thèse visent à mettre en place une méthodologie globale d'extrapolation de bioréacteurs. Le procédé de production de lipase par *Yarrowia lipolytica* a été plus particulièrement investigué, compte tenu de la complexité du système biologique et des paramètres physico-chimiques mis en œuvre. En effet, ce procédé met en œuvre une levure dite non conventionnelle dans un réacteur multiphasique G-L-L comprenant un substrat hydrophobe (le méthyloléate étant utilisé comme source de carbone renouvelable). Du fait du caractère strictement aérobic de ce type de levure, le transfert d'oxygène est un paramètre critique pour ce procédé. Dans un premier temps, l'ensemble des paramètres physico-chimiques clés du procédé ont été investigués (c'est-à-dire la dispersion du méthyloléate, les fluctuations en oxygène dissous et en pH). Cette évaluation a été menée en se basant sur des paramètres physico-chimiques (mélange du réacteur, transfert d'oxygène,...), mais également sur base de paramètres biologiques (synthèse et excrétion de la lipase, activation du gène *lip2*,...). Cette première étude a démontré que le paramètre critique était la fluctuation de l'oxygène dissous, ce paramètre menant à une réduction du rendement spécifique en lipase, liée à une atténuation de l'activité du gène *lip2* codant pour la lipase extracellulaire de *Y. lipolytica*. Ce paramètre est d'autant plus important que les amplitudes des fluctuations en oxygène dissous sont amplifiées lors du processus de montée en échelle pour l'extrapolation du procédé. L'efficacité de dispersion du substrat hydrophobe (méthyloléate) au sein du milieu aqueux ne semble pas avoir d'impact sur l'efficacité du procédé, la levure sécrétant un biosurfactant permettant de stabiliser la dispersion. Les fluctuations en pH ont également peu d'impact sur le rendement de production de lipase, mais des observations au microscope ont révélé un début de dimorphisme cellulaire. Cette observation démontre la complexité de la réponse du système biologique face aux conditions de procédé. L'impact des fluctuations en oxygène dissous sur l'activité du gène *lip2* a été confirmé par des analyses plus poussées en PCR quantitative (RT-qPCR). La deuxième partie du travail a donc été focalisée sur l'optimisation du transfert d'oxygène. Cette optimisation n'est pas triviale si on considère le phénomène de formation de mousse important lorsque la dispersion G-L au sein du réacteur est trop fine. Deux stratégies antimousse ont donc été envisagées : l'une mettant en œuvre l'ajout d'antimousse chimique et l'autre l'emploi d'un briseur de mousse mécanique. Cette dernière méthode s'est révélée inefficace du fait de la formation d'une couche de mousse persistante entre la surface du liquide et la turbine du briseur de mousse. Des analyses en cytométrie en flux ont permis d'observer un phénomène de dimorphisme qui semble lié au passage des cellules microbiennes au travers de cette couche de mousse, ce qui diminue le rendement en lipase. L'ajout d'antimousse chimique a donc été retenu et le transfert d'oxygène a pu être optimisé en fonction de contraintes de formation de mousse en considérant un enrichissement progressif de l'air d'entrée en oxygène pur. La dernière partie du travail a consisté à estimer l'extrapolation du procédé en prenant en compte à la fois les contraintes physico-chimiques du système (optimisation du transfert d'oxygène et limitation de la formation de mousse), ainsi que les contraintes biologiques. Cette extrapolation a tout d'abord été estimée au niveau de réacteurs *scale-down* permettant de reproduire les défauts d'écoulement généralement rencontrés au niveau industriel. De manière surprenante, cette étude a démontré que suite à l'adaptation physiologique des micro-organismes aux conditions d'écoulement, les problèmes de formation de mousse étaient de moins en moins marqués au cours de la montée en échelle du procédé. Cette observation va à l'encontre des calculs du génie chimique qui prédisent une augmentation du volume de mousse généré suite à la montée en volume des bioréacteurs et a été validée au niveau d'un bioréacteur pilote de 500L. Cela nous mène à conclure que la présence d'hétérogénéités au sein du volume réactionnel ne doit pas forcément être considérée comme un facteur négatif et pourrait au contraire être exploitée afin d'améliorer les performances des procédés et le design des bioréacteurs.

**Tambi KAR (2011).** Impact of bioreactor scale-up on *Yarrowia lipolytica* physiology for the production of lipase. (Dissertation in French) ; University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech , (Belgium), p. 130 p., 42 figures.

## Summary

---

The thesis involves the development of a global methodology for bioreactor scale-up. The process of lipase production by *Yarrowia lipolytica* has been particularly investigated since it involves most of the issues experienced in biochemical reactor engineering, i.e. oxygen transfer, substrate heterogeneities and foam formation. The complexity of biological system will be more thoroughly investigated. Indeed, this process involves a non-conventional yeast in a gas-liquid-liquid multiphase reactor including a hydrophobic substrate (methyl oleate is used as a renewable carbon source). Generally, oxygen transfer is a critical parameter for this process owing to the fact that *Y. lipolytica* is a strict aerobe. First, all essential physico-chemical parameters of the process have been investigated i.e. the methyl oleate dispersion, fluctuation of dissolved oxygen and pH fluctuation. This evaluation was conducted on the basis of biological parameters (syntheses and excretion of lipase, activation of gene *lip2*...) beside the physico-chemical parameters (reactor mixing, oxygen transfer...). Following this first screening phase, dissolved oxygen fluctuation has been identified as the critical parameter. This parameter did not lead just to reduction in specific lipase yield, but also reduction in the activity of the gene encoding the lipase extracellular (*lip2*) of *Y. Lipolytica*. This parameter has a special importance since dissolved oxygen fluctuations are amplified during the scaling -up of the process in bioreactor. The influence of hydrophobic substrate dispersion efficiency (méthyloléate) in the aqueous medium was minimized due to the bio-surfactant secretion of yeast which stabilizes the dispersion. The pH fluctuation has also a limited impact on the performance of lipase production, but microscopic observation revealed an early cellular dimorphism. This observation demonstrates the complex response of biological system which was exposed to process-related perturbations. The impact of dissolved oxygen fluctuations on the activity of the *lip2* gene was confirmed by further analysis using quantitative PCR (RT-qPCR). The second part of this work has been focused on the oxygen transfer optimisation, but the main issue identified during this phase was foam formation. Indeed, gas-liquid dispersion within the reactor leads to strong forming issues, especially with the presence of foam stabilisers as the extracellular protein (lipase). Chemical (chemical antifoam addition) and mechanical (mechanical foam breaker) foam control strategies have been investigated in order to evaluate the optimization of the oxygen transfer in function of the foam formation. The mechanical method was proved ineffective because of the formation of a persistent foam layer between the liquid surface and the foam breaker turbine. Flow cytometry analysis have revealed a phenomenon of dimorphism. This phenomenon seems to be associated with the passage of microbial cells through the foam layer where cells are exposed to unsuitable condition causing reduction in the lipase yield. In fact, reduction of the overall oxygen transfer efficiency of the system is inevitable in order to keep antifoam consumption at a reasonable level. A regulation strategy involving oxygen enrichment of the air flow through the reactor has to partly overcome this issue. The last part of the work has been based on the estimation of the impact of the scale-up process by taking into account both the physical and chemical constraints of the system (optimization of oxygen transfer and limiting the formation of foam) and the biological constraints. This scaling-up procedure was firstly estimated in scale-down reactor to reproduce flow defects encountered at the industrial scale. Surprisingly, this study showed that the foaming issues were attenuated in scale-down reactors because of the adaptation of physiological microorganisms to flow conditions. This observation was not consistent with chemical engineering calculations that predict an increase in the volume of foam generated by scaling-up bioreactors. This result has been validated in a 500L pilot bioreactor. Consequently, the presence of heterogeneities in the working volume should not necessarily be considered as a negative factor and could be exploited to improve the performance and the design of bioreactors.

---

## Liste des abréviations

---

<b>RT-qPCR</b>	: quantitative real time polymerase chain reaction
<b>lip2</b>	: <i>lip2</i> gene, encoding extracellular lipase
<b>D</b>	: bioreactor vessel diameter (m)
<b>OTR</b>	: oxygen transfer rate (mmol/L/hr)
<b>K<sub>L</sub>a</b>	: volumetric oxygen transfer coefficient (s <sup>-1</sup> ).
<b>d</b>	: impeller diameter (m)
<b>ρ</b>	: fluid density (kg/m <sup>3</sup> )
<b>N<sub>p</sub></b>	: power number of the stirrer
<b>μ</b>	: fluid viscosity (Pa.s)
<b>N</b>	: agitation rate (min <sup>-1</sup> )
<b>P</b>	: Power consumption (W)
<b>Re</b>	: Reynolds number
<b>Q<sub>recirc</sub></b>	: recirculation flow rate (ml/min)
<b>V</b>	: volume of culture in the bioreacteur (L)
<b>SDR</b>	: scale-down reactor
<b>C-SDR</b>	: controlled scale-down reactor
<b>P-SDR</b>	: partitioned scale-down reactor
<b>DOT</b>	: dissolved oxygen tension (% saturation)
<b>CFM</b>	: chemical foam control strategy
<b>MFM</b>	: mechanical foam control strategy
<b>SAFD</b>	: Stirring As Foam Disruption
<b>CDW</b>	: cell dry weight (g/L)

---



---

# Table des matières

---

## *Introduction générale*

I. Contexte	2
II. Stratégie scientifique	5
III. Structure de la thèse	8

## *Chapitre I : Synthèse bibliographique*

<b>Titre : Dimensionnement et extrapolation des bioréacteurs sur base de paramètres physiologiques : cas de la production de lipase par <i>Yarrowia lipolytica</i></b>	<b>13</b>
Résumé	13
Abstract	14
1.Introduction	14
2.Paramètres de base à prendre en compte lors de la culture d'une levure non conventionnelle à partir d'un substrat hydrophobe	20
3.Premier niveau de dimensionnement des bioréacteurs : paramètres hydrodynamiques	23
3.1. Dimensionnement de base et extrapolation des bioréacteurs mécaniquement agités	23
3.2. Problèmes associés à l'intensification des transferts gaz-liquide	25
4. Deuxième niveau de dimensionnement des bioréacteurs: mesure et contrôle en ligne des paramètres environnementaux	26
4.1. Régulation du pH, de la température, de l'oxygène dissous et du niveau de substrat dans le volume réactionnel	27
4.1. La diminution de l'efficacité de mélange lors de l'extrapolation : cause majeure de perte de rendement des bioprocédés ?	28
5. Troisième niveau de dimensionnement des bioréacteurs: estimation du stress microbien face aux conditions de procédés	29
5.1. Stress environnementaux rencontrés dans les bioprocédés : nature, échelle spatiale et temporelle	29
5.2. Application de la cytométrie en flux pour le suivi des bioprocédés	32
6. Conclusion	33
7. Références bibliographiques	34

## *Chapitre II : Impact de l'environnement extracellulaire des bioréacteurs sur la production de lipase.*

<b>Impact de l'environnement extracellulaire des bioréacteurs sur la production de lipase</b>	<b>38</b>
Résumé	38
Abstract	39

---

---

---

<b>Introduction</b>	<b>40</b>
<b>Material and methods</b>	<b>41</b>
Strain and culture conditions	41
Analytical methods	42
Scale-down reactor strategies	42
<b>Results and discussion</b>	<b>45</b>
Effect of the methyloleate and dissolved oxygen availability: involvement of a partitioned scale-down reactor (P-SDR)	45
Effect of the dissolved oxygen level fluctuations: involvement of a controlled scale-down reactor (C-SDR)	47
Effect of the pH local variations: involvement of a partitioned scale-down reactor (part-SDR)	50
<b>Conclusion</b>	<b>54</b>
<b>References</b>	<b>55</b>

### ***Chapitre III : Impact des limitations en oxygène dissous sur l'activité lip2***

<b>Impact des limitations en oxygène dissous sur l'activité lip2</b>	<b>57</b>
<b>Résumé</b>	<b>57</b>
<b>Abstract:</b>	<b>58</b>
<b>Introduction</b>	<b>58</b>
<b>Materials and methods</b>	<b>61</b>
Strain and culture conditions	61
Analytical methods	62
Extraction and purification of total RNA	63
Real-time PCR conditions	63
Scale-down reactor strategies	64
<b>Results and discussion</b>	<b>65</b>
<b>Conclusion</b>	<b>69</b>
<b>Reference</b>	<b>70</b>

### ***Chapitre IV : Optimisation du transfert d'oxygène et de la régulation antimousse***

<b>Optimisation du transfert d'oxygène et de la régulation antimousse</b>	<b>72</b>
<b>Résumé</b>	<b>72</b>
<b>Abstract</b>	<b>73</b>
<b>Introduction</b>	<b>73</b>
<b>Materials and methods</b>	<b>75</b>
Strain and culture conditions	75
Oxygen transfer rate (KLa) measurement	76
Cell Dry Weight Determination	77
Determination of the lip2:lacZ reporter gene activity by flow cytometry	77
<b>Results and discussion</b>	<b>78</b>
Comparison between mechanical and chemical antifoam methods : constant air flow rate	78

---

---

Comparison between mechanical and chemical antifoam methods : regulation of the dissolved oxygen level by modulating the air flow rate	81
Impact of foam control strategies on the specific rate of lipase production	84
Investigation of the lip2 gene expression at the single cell level	86
<b>Conclusion</b>	<b>89</b>
<b>References</b>	<b>90</b>

## ***Chapitre V : Extrapolation du procédé de production de lipase***

<b>Extrapolation du procédé de production de lipase</b>	<b>93</b>
<b>Résumé</b>	<b>93</b>
<b>Abstract</b>	<b>95</b>
<b>Introduction</b>	<b>96</b>
<b>Materials and methods</b>	<b>97</b>
Strain and culture conditions	97
Bioreactor operations and scale-down experiments	97
Cell Dry Weight Determination	99
Extracellular lipase activity and intracellular <i>lip2</i> level of induction	100
Total carbon and nitrogen sources assay	100
Extraction and purification of total RNA	101
Real-time PCR conditions	101
<b>Results and discussion</b>	<b>103</b>
Effect of the air oxygen enrichment strategy on lipase production	103
Scale-down effect on the oxygen transfer management and related physiological impact	105
confirmation of hte results at the level of pilot-scale, oxygen deficient bioreactor	109
Impact of process conditions on the consumption of carbon and nitrogen sources	111
Investegation athor timescale : scale-down effect on the molecular level <i>Lip2</i> mRNA expression level	113
<b>Conclusion</b>	<b>116</b>
<b>References</b>	<b>117</b>

## ***Chapitre VI : Discussion générale, conclusion générale et perspective***

<b>I. Présentation des principaux résultats</b>	<b>119</b>
<b>II. Discussion et conclusions générales</b>	<b>121</b>
<b>III. Perspectives</b>	<b>126</b>
<b>III. Références</b>	<b>129</b>

---

# Introduction générale

---

# Introduction générale : présentation du contexte, de la stratégie scientifique et de la structure de la thèse

## Contexte

Durant les deux dernières décennies, l'industrie s'est tournée de plus en plus vers le développement de procédés de production utilisant des catalyseurs biologiques, les enzymes, aux dépens des catalyseurs chimiques moins respectueux de notre environnement. Selon un rapport récent, le marché global des enzymes industrielles est estimé à 3,3 milliards de dollars en 2010 (croissance annuelle moyenne de 6 %) (Dewan, 2011). Parmi elle, les lipases présentent de nombreuses potentialités d'utilisations. Elles appartiennent à la classe des hydrolases et sont capables de catalyser non seulement l'hydrolyse des triglycérides en glycérol et acides gras libres à l'interface lipide-eau mais aussi la réaction inverse d'estérification ou de transestérification en absence d'eau.

Ces propriétés spécifiques de biotransformation confèrent aux lipases des possibilités d'application dans des secteurs aussi variés que les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et chimiques, l'industrie des détergents et des cosmétiques, l'environnement (Treichel et al., 2010).

La levure *Y. lipolytica* est bien connue pour sa production de lipase. Plusieurs études, dont certaines ont été menées au sein de notre laboratoire, se sont intéressées à la génétique gouvernant la synthèse et l'excrétion de la lipase de *Y. lipolytica*. La difficulté à ce niveau vient du fait que le processus de production et d'excrétion de la lipase dépend d'un cluster de gènes soumis à des mécanismes de répression/induction (Nga et al., 1989). En effet, la lipase est principalement associée à la cellule en phase de croissance exponentielle avant d'être libérée dans le milieu durant la phase stationnaire. Les matières grasses, et plus particulièrement l'acide oléique, semblent avoir à ce niveau un rôle important dans le

---

relargage de la lipase dans le milieu extracellulaire, celui-ci n'étant pas observé à partir de milieu de culture comprenant du glucose comme source de carbone. Ces mécanismes régissant l'excrétion de la lipase sont critiques dans l'optique de la mise au point d'un procédé de production, les techniques de concentration et de purification, étant beaucoup plus aisées à partir d'un métabolite extracellulaire (Fickers et al., 2004). Le séquençage N-terminal de la protéine purifiée à partir d'un surnageant de culture a permis d'identifier le gène *lip2* comme responsable de l'activité lipase extracellulaire (Destain, 1998). Ce résultat a été par la suite confirmé par une réduction significative de la production de lipase extracellulaire en utilisant une souche mutante *Δlip2* (Fickers et al., 2005a). Au niveau de notre laboratoire, des travaux précédents ont mené à l'obtention d'une souche LgX64.81 hyperproductrice de lipase extracellulaire suite à des manipulations de mutagenèse non dirigée (mutation chimique). De plus, cette souche LgX64.81 s'est montrée être moins sensible à la répression catabolique par le glucose contrairement à la souche sauvage. Par la suite, des expériences ont montré que l'activité hexokinase *HXK1* était plus faible chez le mutant LgX64.81 que chez la souche sauvage. Ces résultats confirment que le gène *lip2* est soumis à la répression catabolique par le glucose et qu'une partie du phénotype hyperproducteur de la souche LgX64.81 est lié à la diminution de l'activité hexokinase (Fickers et al., 2005b). Chez *Candida deformans*, une levure relativement proche phylogénétiquement de *Y.lipolytica*, trois gènes *cdlip1*, *cdlip2* et *cdlip3*, codant pour différentes lipases ont été mis en évidence (Bigey et al., 2003). Le gène *cdlip1* est très semblable à *lip2* avec 92% d'homologie. Le séquençage des acides aminés de *LIP7* et *LIP8* chez *Y.lipolytica* présentent respectivement 87% et 89.2% d'homologie par rapport à *cdLIP2* et *cdLIP3* respectivement. Les lipases *LIP7* et *LIP8* sont associées à la membrane de cellulaire, mais peuvent néanmoins être facilement décrochées par un rinçage avec un tampon de phosphate (Fickers et al., 2005a). Ces résultats suggèrent que *LIP7p* et *LIP8p* pourraient correspondre aux lipases associées à la membrane de cellule décrites

---

précédemment (Ota Y et al., 1982). Les spectres d'activité de ces enzymes semblent montrer que *LIP7p* est spécifique de l'hydrolyse des triglycérides à courtes chaînes d'acide gras tandis que *LIP8p* est spécifique des triglycérides à chaînes carbonées intermédiaires (Fickers, 2004). Des analyses de mutation dirigée confirment l'absence d'activité lipolytique pour une souche dont les gènes *lip2*, *lip7* et *lip8* ont été bloqués, ce qui indique que toutes les lipases extracellulaires ont été identifiées pour *Y.lipolytica* (Fickers et al., 2011).

Ces analyses génétiques montrent donc clairement que le glucose n'est pas un substrat optimal dans le cadre de la production de lipase par *Y. lipolytica*. Il est en effet plus pertinent de se baser sur un substrat hydrophobe pour ce type de procédé. Généralement, les acides gras représentent les principaux constituants des lipides et peuvent être dégradés comme substrat de la levure dans le cycle de la  $\beta$ -oxydation, conduisant à la production d'une grande quantité d'adénosine triphosphate (ATP) (Ratledge, 1984). De plus, *Y. lipolytica* possède de nombreux gènes lui permettant de dégrader une grande diversité d'acides gras (Beopoulos et al., 2009). Il est important de noter que seule la  $\beta$ -oxydation peroxysomale a été reportée chez les levures (Poirier et al., 2006 ) et que cette étape requiert de grandes quantités d'oxygène comme accepteur final d'électron (acyl-CoA oxydase) (Bartlett et al., 1990). L'utilisation de matière grasse comme substrat entraîne donc une demande excessive en oxygène dissous chez *Y.lipolytica*. De plus, le bioréacteur doit également assurer une dispersion la plus fine possible du substrat hydrophobe sous forme de gouttelettes afin d'en faciliter l'assimilation au niveau du métabolisme. Dans le milieu, les triglycérides doivent d'abord être hydrolysés par l'action de la lipase extracellulaire. Les acides gras résultant de l'hydrolyse peuvent par la suite être absorbés dans la cellule. *Y. lipolytica* présente la particularité de synthétiser un biosurfactant (liposan) qui facilite cette étape. Une fois à l'intérieur des cellules, les acides gras entrent dans les voies métaboliques sous forme d'esters de CoA ou des esters de carnitine et sont transportés jusqu'aux peroxysomes où a lieu la  $\beta$ -oxydation. L'activité des enzymes

---

peroxysomales augmente quand les levures sont cultivées dans un milieu contenant des alcanes ou des acides gras, ce qui suggère un effet inducteur de ces substrats (Tanaka et al., 1982; Waché et al., 2002). Outre leur dégradation pour la production directe d'énergie et de carbone, les matières grasses peuvent être intégrées sous forme de réserve dans les cellules. *Y.lipolytica* peut accumuler les lipides jusqu'à une concentration dépassant 50% de la matière sèche cellulaire (Ratledge, 2005). La forme de stockage des lipides consistent en des stérides, dont plus de 90% de triglycérides chez *Y.lipolytica* (Beopoulos et al., 2009). Le stockage a lieu dans des corps lipidiques au sein de la levure qui sont constitués d'un noyau lipidique couvert par une monocouche de phospholipides, dans lequel de nombreuses protéines avec diverses activités biochimiques sont intégrées (Brown, 2001). Les lipides peuvent s'accumuler par deux voies différentes: premièrement par un mécanisme de synthèse *de novo*, impliquant la production des précurseurs de l'acide gras (dans des conditions définies), tels que l'acétyl et le malonyl-CoA et leur intégration dans la voie biosynthétique de stockage des lipides (la voie de Kennedy (Kennedy, 1961)). Deuxièmement par une voie d'accumulation *ex novo*, impliquant l'absorption d'acides gras, les huiles et les triglycérides du milieu de culture et leur accumulation directe dans la cellule. Cette voie nécessite l'hydrolyse du substrat hydrophobe, le transport des acides gras libérés dans la cellule, leur réassemblage dans les fractions des triglycérides et des stérides et leur accumulation dans les lipides (Beopoulos et al., 2009).

Ces données théoriques sur la génétique de la production de lipase et le métabolisme des substrats hydrophobes seront exploitées dans le cadre de la stratégie scientifique de ce travail.

## **Stratégie scientifique**

Les travaux de recherche concernant *Y. lipolytica* au niveau du laboratoire ont débuté suite à l'isolement d'une souche productrice d'une lipase acidophile. Dans une première phase, la souche microbienne originale a été modifiée par mutagenèse chimique afin d'accroître la

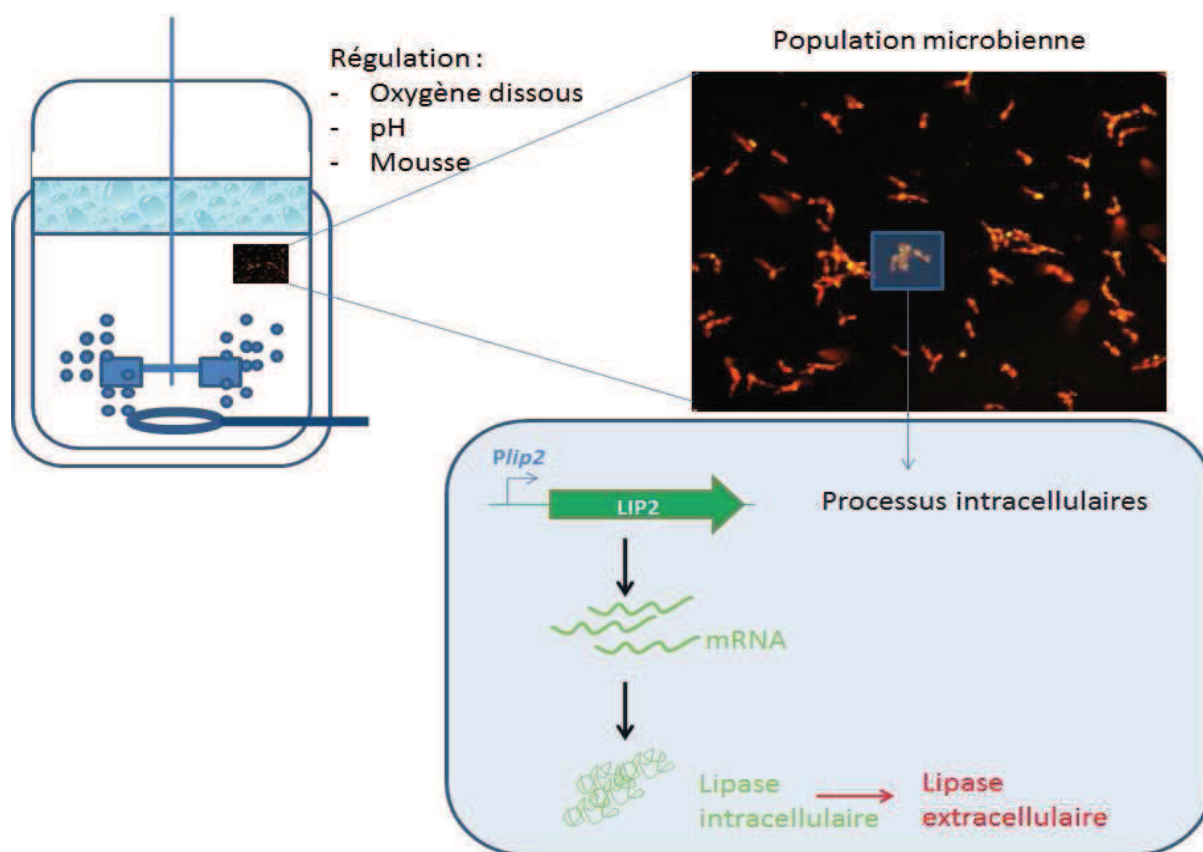


---

capacité de production de lipases sous forme extracellulaire (Destain et al., 1997). Le séquençage N-terminal de la protéine à partir d'un surnageant de culture, a permis de confirmer que le gène *lip2* code bien pour la lipase extracellulaire (Pignède et al., 2000). Dans une seconde phase, un système de gène rapporteur a été élaboré (gène rapporteur *LacZ* contrôlé par le promoteur *lip2* (Destain et al., 1997; Fickers et al., 2003) et mis en œuvre dans la souche *Y. lipolytica* JMY775. L'utilisation de cette souche microbienne modifiée permettra dans le cadre de ce travail de déterminer rapidement la dynamique d'activation du promoteur *lip2* responsable de la synthèse de la lipase principale de *Y. lipolytica*. Le but de ce travail est en effet de mettre en œuvre la souche *Y. lipolytica* JMY775 dans un procédé aérobique intensif de production de lipase à partir d'un substrat renouvelable hydrophobe (méthyloléate). La sensibilité à l'extrapolation (*scale-up*) de ce procédé sera également estimée par une approche *scale-down* (c'est-à-dire en générant à l'échelle du laboratoire des défauts d'écoulement et/ou de transfert susceptibles d'être rencontrés à l'échelle industrielle) des principaux paramètres environnementaux susceptibles d'influencer la dynamique de production de lipase. Dans cette optique, l'efficacité de dispersion du substrat hydrophobe, les fluctuations spatiales et temporelles en oxygène dissous, ainsi que les fluctuations de pH seront dans un premier temps estimées par la mise en place de plusieurs dispositifs de culture dédiés (réacteurs *scale-down*). L'originalité de ce travail est que l'impact du procédé sera estimée non seulement sur base de paramètres de performance indirects (c'est-à-dire, les rendements globaux en biomasse et lipase extracellulaire ainsi que l'évolution des paramètres physico-chimiques du bioréacteurs), mais également sur base de paramètres de performances directement en relation avec la physiologie de la souche microbienne (dans notre cas, le niveau d'expression du gène *lip2* a été estimé par quantification des ARNm et par suivi de la synthèse intracellulaire de la lipase à l'échelle de la cellule). Cette approche doit permettre de mettre en évidence l'impact direct des conditions environnementales du bioréacteur sur les différents étapes de la

production de la lipase : de l'activation du gène jusqu'à l'excrétion de l'enzyme, en passant par les étapes de transcription et de traduction.

L'approche scientifique développée au cours de ce travail est constituée de plusieurs étapes qui ont fait l'objet chacune d'un chapitre de cette thèse. Cette démarche est donc résumée dans les lignes qui suivent en faisant référence aux chapitres correspondants. La figure 1 reprend les principales interactions bioréacteur – système microbien qui ont été plus particulièrement étudiées au cours de ce travail.



**Figure 1** : Présentation des principaux processus physico-chimiques et biologiques abordés au cours de ce travail. L'accent sera mis sur l'interaction entre ces différents processus, et plus particulièrement l'impact des conditions environnementales sur la physiologie relative à la synthèse de lipase (la photographie en microscopie à fluorescence présente des cellules de *Y. lipolytica* colorées à l'aide de rouge du Nil)

---

## Structure de la thèse

L'optimisation de la culture en bioréacteur est une base indispensable pour l'exploitation de *Y. lipolytica* dans une optique de production de la lipase. L'extrapolation des opérations à des volumes de culture industriels est requise afin d'obtenir un procédé économiquement viable. Une introduction générale concernant les approches de l'extrapolation des bioprocédés est présentée au **chapitre 1**. L'extrapolation des bioréacteurs est souvent une étape limitant pour le développement des bioprocédés du fait des nombreux paramètres physiques et biologiques à prendre en compte. Les perturbations sont assez faciles à contrôler à petite échelle, alors que seulement quelques paramètres peuvent être maintenus lorsque le volume de bioréacteur augmente, la perte de l'efficacité hydrodynamique induisant l'apparition de gradients de concentration. Dans les bioréacteurs industriels, la circulation des cellules au sein du milieu hétérogène impose des fluctuations micro-environnementales de différentes amplitudes et de différentes intensités. Ces changements peuvent entraîner plusieurs contraintes environnementales comme la température, le pH, la concentration en oxygène dissous et la disponibilité des nutriments (Hewitt et al., 2007; Lara et al., 2006), se traduisant par un stress au niveau cellulaire. La manière dont ces stress affectent la physiologie microbienne n'a pas encore bien été caractérisée. Le but de ce travail vise donc à mieux comprendre l'impact des conditions environnementales sur la réponse physiologique de *Y. lipolytica*. La stratégie expérimentale met donc en œuvre des outils permettant de caractériser et de maîtriser d'une part les gradients de concentration au niveau d'un réacteur *scale-down* et d'autre part de caractériser l'impact de ces gradients à différents niveaux de la chaîne de synthèse de la lipase, c'est-à-dire de l'activation du gène *lip2* jusqu'à l'excrétion de la lipase dans le milieu extracellulaire. Le réacteur *scale-down* est un dispositif expérimental permettant de représenter à petite échelle les conditions de mélange des réacteurs de volume industriel. Ce concept a été proposé à l'origine par Oosterhuis en 1985 (Oosterhuis et al., 1985).

---

La première partie de ce travail a été consacrée à la détermination de l'effet de plusieurs types de bioréacteurs *scale-down* sur l'évolution de la biomasse et de la production de lipase. Ces bioréacteurs ont été dimensionnés autour de trois phénomènes importants susceptibles d'influencer les rendements de production de lipase: l'hétérogénéité de la disponibilité en oxygène dissous, l'intensité de la dispersion liquide-liquide et la fluctuation de pH. Cette première phase du travail a montré un effet dominant de la fluctuation de la concentration en oxygène dissous. Ces résultats sont présentés au niveau du **chapitre 2**.

Les fluctuations en oxygène dissous sont dues à l'hétérogénéité du coefficient de transfert de l'oxygène dans les bioréacteurs de grand volume. Dans les zones situées à proximité des mobiles d'agitation, le transfert d'oxygène est largement suffisant. Par contre, plus on s'éloigne de ces zones, plus le coefficient de transfert diminue jusqu'à devenir insuffisant. Cette hétérogénéité entraîne un manque d'oxygène dissous et un stress de *Y. lipolytica*. Ce stress se traduit par une diminution de biomasse et de rendement de lipase. Dans une seconde phase du travail expérimental, l'oxygène dissous a donc été étudié de manière isolée des autres conditions environnementales à l'aide d'un bioréacteur *scale-down* spécialement dimensionné pour estimer son impact au niveau de la voie de sécrétion de la lipase. Trois étapes de synthèse de la lipase ont été étudiées à partir de ce réacteur : le niveau d'expression du gène *lip2* codant pour la lipase (par RT-qPCR), la traduction des ARNm en protéines (par un système rapporteur *LacZ*) et l'excrétion de la lipase dans le milieu de culture (par dosage de l'activité lipase dans le milieu de culture). Les résultats de cette analyse sont décrits dans le **chapitre 3**.

Dans le cas de *Yarrowia lipolytica*, micro-organisme aérobic strict, l'apport en oxygène est un paramètre critique (Lopes, 2008). La vitesse de transfert de l'oxygène doit donc être maximisée en prenant en compte le phénomène de moussage. Il est possible d'augmenter communément le  $K_{La}$ , et par conséquent le taux de transfert d'oxygène (OTR), en augmentant

---

la vitesse du mobile l'agitation et le débit d'injection d'air. Néanmoins, cette méthodologie entraîne la formation de mousse. La formation de mousse est un problème technologique majeur qui compromet la stérilité des systèmes de culture et le rendement final du procédé (Vardarsukan, 1991) (Junker, 2007). Les agents antimousses sont nécessaires dans de nombreuses fermentations pour éviter un débordement du réacteur et un risque de contamination. Ces composés sont des agents de surface qui favorisent la coalescence des bulles constituant de la mousse. L'action coalescente, qui permet de briser la mousse, réduit l'aire interfaciale au sein du liquide. Un compromis doit être trouvé au niveau d'une opération d'agitation/aération assurant un bon transfert d'oxygène tout en limitant la formation de mousse (Delvigne et al., 2010). Une alternative à l'utilisation d'antimousse chimique est l'utilisation d'un briseur de mousse mécanique placé dans l'espace de tête du réacteur. Ces deux approches ont été étudiées dans le cadre de ce travail afin d'optimiser le transfert d'oxygène tout en limitant au maximum la formation de mousse. Ces résultats sont décrits dans **le chapitre 4**.

Afin de mieux élucider l'influence de l'extrapolation (l'effet de la fluctuation de l'oxygène dissous) sur la réponse physiologique et physicochimique, un système d'enrichissement en oxygène du flux gazeux entrant dans le réacteur a été employé pour éliminer complètement l'effet de la limitation en l'oxygène dans la partie mélangée du bioréacteur *scale-down*. Cette méthodologie permet également de limiter la formation de mousse tout en se focalisant sur l'effet physiologique du manque en oxygène subi par les cellules traversant la partie tubulaire du réacteur *scale-down*. Nous avons mis en œuvre ce travail dans **le chapitre 5**.

---

## Références

- Bartlett, K., Hovik, R., Eaton, S., Watmough, N. J., & Osmundsen, H. 1990. Intermediates of peroxisomal beta-oxidation. A study of the fatty acyl-CoA esters which accumulate during peroxisomal beta-oxidation of [U-14C]hexadecanoate. *Biochemical Journal*, 270(1): 175-180.
- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribe Larrea JL, Molina-Jouve C, & Nicaud JM. 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48(6): 375-387.
- Bigey, F., Tuery, K., Bougard, D., Nicaud, J.-M., & Moulin, G. 2003. Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. *Yeast*, 20(3): 233-248.
- Brown, D. A. 2001. Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat. *Current Biology*, 11(11): R446-R449.
- Delvigne, F., & Lecomte, J. P. 2010. Foam formation and control in bioreactors, *Encyclopedia on industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technologies*: Wiley.
- Destain, J. 1998. *Production, purification et caractérisation de la lipase de Yarrowia lipolytica*. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux.
- Destain, J., Roblain, D., & Thonart, P. 1997. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 19(2): 105-108.
- Dewan, S. S. 2011. Enzymes in Industrial Applications: Global Markets, Vol. 2011: bccresearch.
- Fickers, P. 2004. *Etude des lipases extracellulaires de la levure Yarrowia lipolytica*. Université de Liège, Liège.
- Fickers, P., Fudalej, F., Dall, M. T. L., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P., & Nicaud, J. M. 2005a. Identification and characterisation of lip7 and lip8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(3): 264-74.
- Fickers, P., Marty, A., & Nicaud, J. M. 2011. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, In Press, Corrected Proof.
- Fickers, P., Nicaud, J., Destain, J., & Thonart, P. 2005b. Involvement of Hexokinase Hxk1 in Glucose Catabolite Repression of *LIP2* Encoding Extracellular Lipase in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 50(3): 133-137.
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Destain, J., & Thonart, P. 2003. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(2): 136-142.
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J., & Thonart, P. 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4): 742-749.
- Hewitt, C., & Nienow, A. 2007. The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes. *Advances in Applied Microbiology*, 62: 105-135.
- Junker, B. 2007. Foam and Its Mitigation in Fermentation Systems. *Biotechnology Progress*, 23: 767-784.
- Kennedy, E. P. 1961. Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc*, 20: 934-940.

- 
- 
- Lara, A. R., Galindo, E., Ramirez, O. T., & Palomares, L. A. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors. *Molecular Biotechnology*, 34(3): 355-381.
- Nga, B., Gaillardin, C., Fournier, P., & Heslot, H. 1989. Genetic analysis of lipase low producing mutant of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of General Microbiology* 135: 2439-2443.
- Oosterhuis, N. M. G., Kossen, N. W. F., Olivier, A. P. C., & Schenk, E. S. 1985. Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Bioengineering*, 27(5): 711-720.
- Ota Y, Gomi S, Morimoto Y, & Minod Y. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agricultural Biology and Chemistry*, 46: 2885-2889.
- Pignède, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M., & Nicaud, J. M. 2000. Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. 182(10): 2802-2810.
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, & Hiltunen JK. 2006 Peroxisomal beta-oxidation a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12): 1413-1426.
- Ratledge, C. 1984. Microbial conversions of alkanes and fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(2): 447-453.
- Ratledge C. 2005. Single cell oils for the 21st century. In R. Cohen (Ed.), *Single cell oils*: 1-20. Champaign: OCS Press.
- Tanaka, A., Osumi, M., & Fukui, S. 1982. Peroxisomes of alkane-grown yeast fundamental and practical aspects *Annals of the New York Academy of Sciences*, 386(1): 183-199.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M., Di Luccio, M., & Oliveira, J. 2010. A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2): 182-196.
- Vardarsukan, F. 1991. Effects of Natural Oils on Foam Collapse in Bioprocesses. *Biotechnology Letters*, 13(2): 107-112.
- Waché, Y., Aguedo, M., LeDall, M.-T., Nicaud, J.-M., & Belin, J.-M. 2002. Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s [beta]-oxidation pathway for [gamma]-decalactone production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20: 347-351.

# Chapitre I

---

## Synthèse bibliographique

**Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :**

Kar, T., Delvigne, F., Destain, J., Thonart, P. (2011). Dimensionnement et extrapolation des bioréacteurs sur base de paramètres physiologiques: cas de la production de lipase par *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnologie. Agroomie. Société et Environnement*, 15(4): 1-11.



# **Dimensionnement et extrapolation des bioréacteurs sur base de paramètres physiologiques : cas de la production de lipase par *Yarrowia lipolytica***

## **Résumé :**

L'extrapolation des bioréacteurs est souvent une étape limitante pour le développement des bioprocédés du fait des nombreux paramètres physiques et biologiques à prendre en compte. Dans ce travail, les procédures classiques d'extrapolation des bioprocédés reposant sur les aspects du génie chimique et du génie des procédés seront abordées dans un premier temps. Ces approches traditionnelles seront comparées à une nouvelle méthodologie mettant en œuvre les paramètres physiologiques directs relatifs au comportement de la souche microbienne cultivée dans le bioréacteur. Cette approche « physiologique » met en œuvre des paramètres en relation direct avec la physiologie du micro-organisme, comme par exemple l'induction d'un gène spécifique dans des conditions extracellulaires données. Cette méthodologie ouvre de nombreuses possibilités au niveau du contrôle des bioprocédés, comme le suivi d'un paramètre physiologique à l'échelle de la cellule individuelle. Elle est développée dans le cas d'un procédé de production de lipases par *Y. lipolytica*.

## Résumé

L'extrapolation des bioréacteurs est souvent une étape limitante pour le développement des bioprocédés du fait des nombreux paramètres physiques et biologiques à prendre en compte. Dans ce travail, les approches classiques de l'extrapolation des bioprocédés reposant sur les aspects du génie chimique et du génie des procédés seront abordées comme premier niveau d'approche. Ces approches traditionnelles seront comparées à une approche plus récente basée sur les paramètres physiologiques directs mettant en œuvre le comportement de la souche microbienne dans le bioréacteur. Cette approche "physiologique" est innovante car elle fait intervenir des paramètres en relation directe avec la physiologie du micro-organisme, comme par exemple l'induction d'un gène spécifique dans des conditions extracellulaires données, et ouvre donc de nombreuses possibilités au niveau du contrôle des bioprocédés. Ce principe sera développé ici dans le cadre du suivi de la production de lipases par *Y. lipolytica* à l'échelle de la cellule individuelle.

## Mots-clés

Mélange, hétérogénéité, stress microbien, cytométrie en flux, gène rapporteur, *Yarrowia lipolytica*

## Abstract

Bioreactor scale-up often pose a serious issue during the industrial development of a bioprocess considering the numerous physical and biological phenomena occurring in the reacting volume. The basic principles of scale-up coming from the traditional chemical and process engineering approaches will be first reviewed and will be then compared to a new one involving recent development at the level of microbial strain manipulation. This "physiological" approach of scale-up involves directly a biological component of the system

(by comparison with the traditional approach for scaling-up involving physical parameters indirectly linked to the physiological phenomena occurring in the bioreactor), i.e. the synthesis of a reporter fluorescent protein when microbial cells are exposed to stress. It will be shown how this principle can be used for a better understanding of the relationship between bioreactor hydrodynamics and microbial stress.

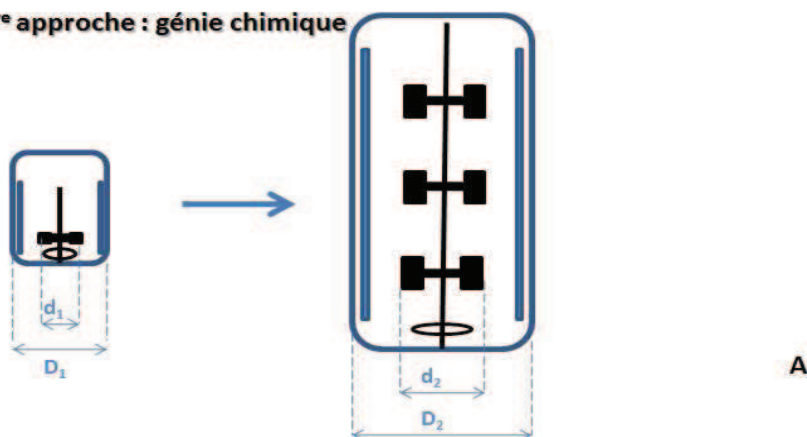
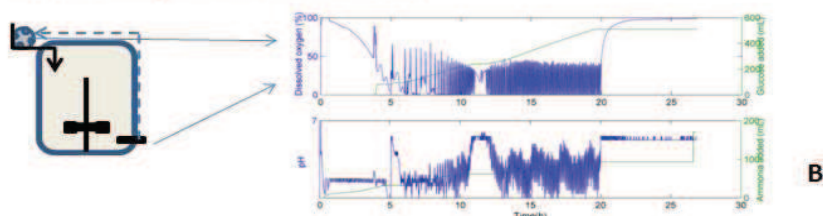
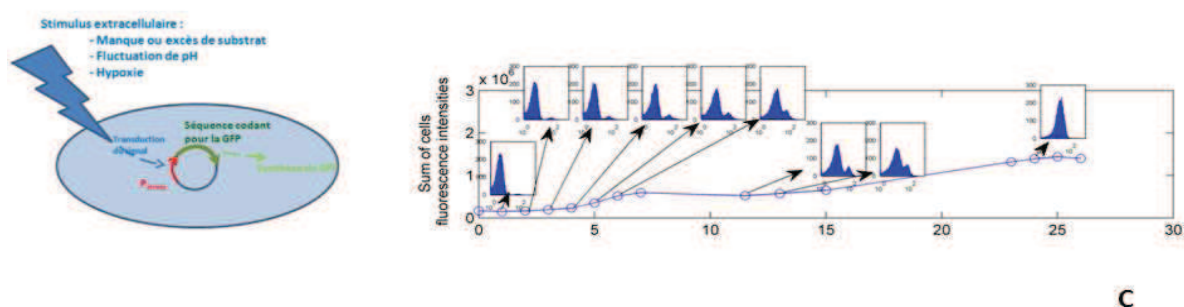
### **Keywords**

Mixing, heterogeneities, microbial stress, flow cytometry, reporter gene, *Yarrowia lipolytica*

## 1. Introduction

L'extrapolation d'un bioprocédé est une étape critique qui garantit la viabilité économique du bioproduit visé. Elle consiste à augmenter le volume du bioréacteur afin d'atteindre une productivité suffisante, et ce, en maintenant autant que possible les rendements obtenus lors des tests en laboratoire ou à l'échelle pilote. Pour la plupart des produits biotechnologiques (antibiotiques, alcools, acides organiques, acides aminés, enzymes, probiotiques), un procédé viable n'est atteint que pour des volumes de bioréacteur de quelques centaines de milliers de litres. Ces volumes permettent de satisfaire une demande de marché importante (de 102 à 107 tonnes/an) pour des produits de faible valeur ajoutée (de 0,5 à 100 euros/kg). A côté de ces bioproduits de faible valeur ajoutée, les produits biotechnologiques plus fins (vaccins, protéines recombinantes thérapeutiques,...) permettent d'atteindre des valeurs ajoutées significativement plus importantes (de l'ordre de 104 à 109 euros/kg). Par contre, leur demande mondiale est nettement moindre (de 0,1 à 1000 kg/an) et leur développement ne nécessite donc pas une étape d'extrapolation importante. Ces procédés à haute valeur ajoutée requièrent des volumes de culture industriels plus modestes, de l'ordre de quelques dizaines de mètres cubes et peuvent mettre en œuvre des cultures microbiennes ou des cultures cellulaires (cellules animales, végétales, d'insecte,...) (Palomares, 2010). Dans ce travail, nous développerons plus en détail les processus d'extrapolation pour des bioproduits d'origine microbienne (c'est-à-dire issus de bactéries, de levures ou de moisissures). L'extrapolation des bioprocédés peut être abordée de différentes manières comme montré à la figure 1. La première approche est celle du génie chimique (figure 1A) et consiste à calculer la variation de paramètres de l'opération de mélange (comme la puissance dissipée  $P$  par l'agitateur, le nombre de Reynolds  $Re$  qui caractérise le type d'écoulement qui règne dans la cuve,...) lorsque l'extrapolation du réacteur (de dimension caractéristique  $D$  correspondant au diamètre de la cuve) est effectuée en maintenant un ou plusieurs paramètres d'agitation constants. Ce

premier niveau d'approche de l'extrapolation est le plus simple et est encore d'application de nos jours. Néanmoins, nous verrons dans la première partie de cet article que cette approche est loin d'être suffisante, d'une part parce qu'elle ne garantit pas un maintien des paramètres de l'opération de mélange lorsque la taille du réacteur augmente (hétérogénéité au sein du volume réactionnel), et d'autre part parce qu'elle ne tient pas compte de la physiologie des micro-organismes. La seconde approche (Figure 1B) consiste à étudier les relations entre les paramètres de performance (coefficient de transfert d'oxygène  $KLa$ , temps de mélange  $t_m$ ,...) et les rendements de procédé (quantité de biomasse ou de métabolites produite) ou l'évolution des conditions physico-chimiques au sein du réacteur (pH, oxygène dissous,  $CO_2$ , température,...). Cette approche est complémentaire à la première décrite, puisque les paramètres de performance dépendent directement de l'efficacité de l'opération de mélange, cette dernière étant proportionnelle à la quantité d'énergie investie au niveau des mobiles d'agitation (Nienow A.W., 1998). L'avantage de cette approche est qu'elle peut être directement implémentée au niveau du bioréacteur industriel en mettant en place un système de régulation adapté et permet donc de suivre en ligne les demandes de la population microbienne cultivée. Par exemple, le niveau d'oxygène dissous dans le réacteur (condition physico-chimique) peut être maintenu à un niveau constant en augmentant progressivement le  $KLa$  du réacteur par modulation du débit d'air et/ou la vitesse d'agitation en fonction des besoins du micro-organisme. Les problèmes de cette approche sont de trois types : premièrement, les types de sonde disponibles sont limités et leur mesure est indirecte par rapport à la physiologie du micro-organisme ; deuxièmement, au fur et à mesure de l'augmentation de la taille des bioréacteurs, les conditions physico-chimiques vont être de plus en plus hétérogènes du fait de la baisse de l'efficacité de mélange du réacteur.

**1<sup>ère</sup> approche : génie chimique****2<sup>ème</sup> approche : étude des paramètres de performance du bioprocédé (paramètres indirects)****3<sup>ème</sup> approche : utilisation de paramètres physiologiques directs**

**Figure 1 :** différents niveaux de dimensionnement peuvent être mis en œuvre pour l'extrapolation des procédés. A : approche classique du génie chimique permettant de calculer des paramètres hydrodynamiques globaux lors du passage de l'échelle D1 à l'échelle D2. B : approche expérimentale mettant en œuvre l'étude des paramètres de performance indirects du bioprocédé (évolution de l'oxygène dissous, dynamique d'ajout du substrat,...) et les systèmes de régulation de ces paramètres. C : approche expérimentale mettant en œuvre des paramètres physiologiques directs. Dans l'exemple, le schéma représente une cellule microbienne génétiquement modifiée afin de produire une protéine fluorescente lorsqu'elle est soumise à un stress.

Une mesure réalisée en un point ne sera donc pas représentative du comportement global du bioréacteur. Troisièmement, la population microbienne présente dans le réacteur est considérée comme homogène. De nombreuses études réalisées avec des outils microbiologiques adaptés (décrits dans le paragraphe 4) ont montré que la population

microbienne pouvait être ségrégée au niveau d'une ou plusieurs caractéristiques cellulaires (taille et forme des cellules, viabilité, capacité de synthèse d'une enzyme particulière,...) (Müller, 2010).

La troisième approche (Figure 1C) est basée sur l'analyse de l'évolution du bioprocédé à l'échelle de la cellule microbienne et tient compte des limitations relevées lors des deux précédentes approches. L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet de prendre en compte à la fois l'hétérogénéité de la population microbienne et l'hétérogénéité spatiale du milieu réactionnel.

Il est intéressant de noter que l'évolution dans les approches d'extrapolation des bioréacteurs s'effectue en considérant une échelle spatiale de plus en plus petite, de quelques mètres (échelle caractéristiques du procédé industriel pouvant être représenté par le diamètre du réacteur D) jusqu'au micron (échelle caractéristique du micro-organisme). Cette multiplicité au niveau des échelles spatiales à considérer est une des clés du succès de l'extrapolation d'un bioprocédé. Nous verrons en effet que différentes échelles spatiales et temporelles caractérisent le comportement du bioréacteur (système physique à extrapoler) et la réaction de la population microbienne (système biologique qui conditionne le rendement du bioprocédé). L'évolution des différentes approches d'extrapolation des bioprocédés sera illustrée par un procédé de production de lipase par *Yarrowia lipolytica*. *Y. lipolytica* est une levure non conventionnelle dont la culture entraîne une série de contraintes au niveau du dimensionnement du bioréacteur. L'étude de ce cas particulier illustre bien l'importance des caractéristiques du micro-organisme pour l'élaboration du procédé.

## 2. Paramètres de base à prendre en compte lors de la culture d'une levure non conventionnelle à partir d'un substrat hydrophobe

Les techniques d'extrapolation des bioréacteurs exposées lors de la section précédente ont été particulièrement bien éprouvées pour toute une série de micro-organismes conventionnels, tels que *Escherichia coli* (bactérie Gram négative utilisée pour l'expression de protéines recombinantes), *Bacillus subtilis* (bactérie Gram positive utilisée pour la production d'enzymes, de peptides à activités biologiques ou encore pour la production de protéines recombinantes) et *Saccharomyces cerevisiae* (levure Crabtree positive) (Junker B.E., 2004).

Nous allons considérer ici les techniques d'extrapolation à mettre en œuvre dans le cas de la levure non conventionnelle *Yarrowia lipolytica*. Le terme non conventionnel signifie ici que *Y. lipolytica* ne fait pas partie des micro-organismes les plus couramment utilisés au niveau industriel. Néanmoins, le génome de *Y. lipolytica* a, comme les micro-organismes de référence cités plus haut, été complètement séquencé (Dujon, 2004). La plupart des données génomiques concernant *Y. lipolytica* ont été compilées sur des bases de données telles que KEGG (Kaneshina, 2000). *Y. lipolytica* fait partie des micro-organismes dits "oléagineux", c'est-à-dire capables d'accumuler des lipides à des niveaux pouvant atteindre plus de 40% de leur biomasse (Beopoulos, 2009a). De plus, *Y. lipolytica* possède les voies métaboliques nécessaires à l'assimilation des substrats hydrophobes (Beopoulos, 2009b). La dégradation des substrats hydrophobes fait notamment intervenir une lipase codée par le gène *lip2* qui présente de nombreux intérêts technologiques (Destain J., 1997; Yu, 2007). La mise en œuvre d'un procédé de production de lipase par *Y. lipolytica* doit donc être envisagée sur base d'un substrat hydrophobe (Nicaud, 2002). Afin de garantir une viabilité économique au procédé, une source de carbone issue de la valorisation de sous-produits industriels est préférable, comme par exemple le méthyl oléate (Destain J., 2005). Cette source de carbone hydrophobe a été comparée à d'autres substrats et montre des potentialités importantes pour la production de lipases (Fickers P., 2005b; Fickers P., 2004). Un paramètre essentiel pour la réussite du

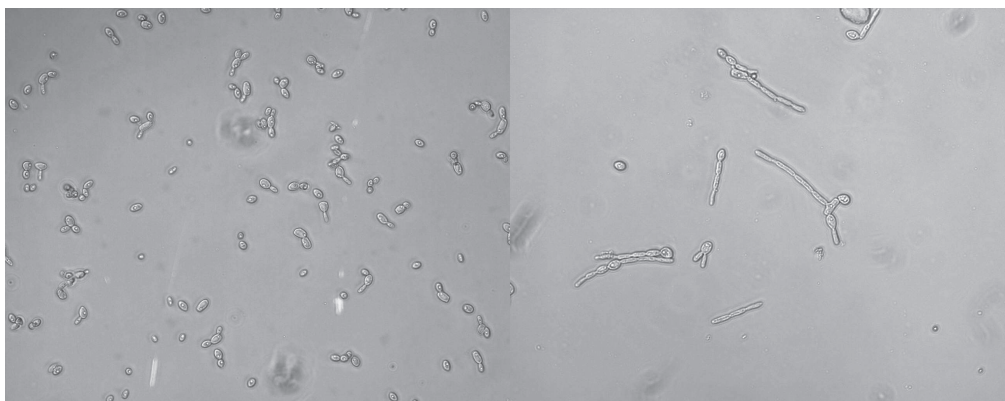


procédé est l'excrétion du produit dans le milieu extracellulaire. En effet, les étapes d'extraction et de purification des produits intracellulaires sont coûteuses et difficiles à mettre en œuvre industriellement. Le lipase LIP2 est une enzyme extracellulaire, mais les conditions de procédés doivent être optimisées afin de favoriser son excrétion (Nicaud, 2002; Pereira-Meirelles, 2000).

Le substrat n'étant pas soluble dans la phase aqueuse, les conditions d'agitation doivent être optimisées afin de déterminer sa dispersion. Cette optimisation doit être effectuée en prenant en compte l'effet du stress mécanique sur le micro-organisme. La sensibilité au stress mécanique (stress de cisaillement subi par les micro-organismes lors de leur passage au niveau de l'agitateur) dépend fortement de la taille du micro-organisme par rapport à la plus petite échelle de turbulence, dite échelle de Komogoroff, rencontrée dans le volume réactionnel. Pour des puissances d'agitation classiquement rencontrées dans les bioréacteurs (30 W/Kg), cette échelle peut être estimée à 10  $\mu\text{m}$  (Hewitt, 2007). Cela signifie que toute particule dont la taille est inférieure à 10  $\mu\text{m}$  ne ressent pas le stress de cisaillement. Néanmoins, dans certaines conditions, *Y. lipolytica* montre un phénomène de dimorphisme cellulaire (Zinjarde, 1998), c'est-à-dire un allongement de la taille des cellules vers une morphologie mycélienne (Figure 2). Les conditions environnementales induisant le dimorphisme cellulaire ne sont pas encore bien connues (Herrera, 2002), mais plusieurs études ont montré que le pH du milieu avait un impact significatif sur ce phénomène (Kar, 2008; Szabo R., 2002). Cet allongement de la taille des cellules doit être pris en compte pour le dimensionnement du procédé, car il augmente la sensibilité du micro-organisme aux contraintes mécaniques.

Un autre paramètre critique lors de la culture en bioréacteur est l'aération. Dans le cas de *Y. lipolytica*, micro-organisme aérobic strict, l'apport en oxygène est un paramètre critique

(Lopes, 2008). La vitesse de transfert de l'oxygène doit donc être maximisée en prenant en compte le phénomène de moussage



**Figure 2 :** photographie au microscope de *Y. lipolytica*. A : cellules en croissance dans un bioréacteur ; B : cellules soumises à un choc pH induisant un phénomène de dimorphisme (Kar, 2008)

En effet, les milieux industriels contiennent des substrats protéiques qui stabilisent la mousse. Lors des processus aérobies intensifs, un compromis doit être trouvé au niveau d'une opération d'agitation/aération assurant un bon transfert d'oxygène tout en limitant la formation de mousse (Delvigne, 2010). Généralement, la formation de mousse peut être limitée en considérant un système de régulation permettant l'ajout d'agents antimoussants lors de la culture (Etoc, 2006). Néanmoins, l'ajout d'antimousse chimique limite la capacité de transfert d'oxygène du réacteur et entraîne de nombreux problèmes lors de la purification de la lipase (Fickers P., 2006).

Les caractéristiques de la levure *Y. lipolytica* soulignées dans ce paragraphe montrent bien la sensibilité de ce micro-organisme face aux conditions environnementales rencontrées dans les bioréacteurs. L'extrapolation du procédé devra donc être effectuée en prenant en compte les caractéristiques physiologiques propres à ce type de micro-organisme. Les paragraphes suivants illustreront comment les trois approches d'extrapolation décrites à la figure 1 peuvent être employée pour la mise au point industrielle d'un procédé mettant en œuvre cette levure non conventionnelle.

### **3. Premier niveau de dimensionnement des bioréacteurs : paramètres hydrodynamiques**

A l'échelle industrielle, les cultures microbiennes ou cellulaires sont dans la majorité des cas réalisées dans des bioréacteurs (également appelés fermenteurs dans le cas des cultures microbiennes) pouvant être mécaniquement agités (agitation directe par un mobile) ou pneumatique (agitation indirecte effectuée par injection d'air). Notons également à ce niveau le récent intérêt de l'industrie pharmaceutique pour les réacteurs dits "disposables" ou jetables. A l'heure actuelle, ces bioréacteurs en matières plastiques ont des volumes restreints à quelques centaines de litres et sont limités à des applications de type culture cellulaire pour des produits à très haute valeur ajoutée. Les principes de dimensionnement qui seront énoncés dans les paragraphes qui suivent seront donc limités aux bioréacteurs classiques mécaniquement agités qui sont les équipements les plus largement répandus à l'échelle industrielle (Charles, 2010).

D'un point de vue géométrique, l'extrapolation peut être représentée suivant le schéma montré à la figure 1A où le calcul consiste à suivre l'évolution des paramètres de l'opération de mélange lorsque le diamètre du bioréacteur passe de  $D_1$  à  $D_2$ . Les calculs d'extrapolation requièrent la connaissance de plusieurs variables de l'opération de mélange qui seront brièvement présentées au paragraphe suivant.

#### **3.1. Dimensionnement de base et extrapolation des bioréacteurs mécaniquement agités**

La première étape du dimensionnement d'un bioréacteur mécaniquement agité consiste à déterminer le régime d'écoulement du fluide agité : laminaire, transitoire ou turbulent. Il est en effet important, dans la plupart des cas, d'opérer en régime turbulent afin d'intensifier les opérations de transfert (masse, chaleur et quantité de mouvement). Le calcul du régime

d'écoulement au sein d'un bioréacteur mécaniquement agité peut être effectué à l'aide d'un nombre de Reynolds adapté :

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot d^2}{\eta}$$

Avec  $\rho$  étant la masse volumique du fluide agité ( $\text{kg/m}^3$ ),  $N$  le taux d'agitation ( $\text{s}^{-1}$ ),  $d$  le diamètre du mobile d'agitation (m),  $\eta$  la viscosité du fluide (Pa.s).

Dans le cas de l'eau,  $\rho$  est de  $1000 \text{ Kg/m}^3$  et  $\eta$  est de  $0,001 \text{ Pa.s}$ . Dans les milieux dont la rhéologie est proche de celle de l'eau, on obtient donc facilement un nombre de Reynolds important. Pour  $Re > 10^4$ , le milieu agité est considéré comme étant en écoulement turbulent.

Le fait d'opérer en écoulement turbulent permet de simplifier le calcul des paramètres de base de l'opération de mélange, telle que la puissance dissipée au niveau du mobile d'agitation. Cette puissance  $P$  peut être calculée à l'aide de la relation suivante :

$$P = \rho \cdot N_p \cdot N^3 \cdot d^5$$

Avec  $N_p$  correspondant au nombre de puissance ou de Newton. Ce terme est constant en régime d'écoulement turbulent (il ne dépend que du type de mobile d'agitation utilisé et est généralement fourni par le concepteur).

Le calcul de la puissance dissipée par le système d'agitation est une étape importante lors du dimensionnement d'un bioréacteur. En effet, plus cette puissance est importante et plus l'intensité des opérations de transfert sera grande au sein du fluide agité. Des corrélations directes sont en effet observées entre la puissance dissipée et le temps d'homogénéisation du réacteur, ainsi que du coefficient de transfert d'oxygène (Palomares, 2010). Ces deux

paramètres constituent souvent les étapes limitantes de l'extrapolation des bioprocédés. La puissance dissipée est souvent considérée comme un invariant dans les calculs d'extrapolation. Un invariant est un paramètre de l'opération de mélange qui a été identifié comme ayant un impact majeur sur le procédé et qui est maintenu constant lors de l'extrapolation. Il permet de fixer l'évolution de l'échelle temporelle du procédé. Dans les bioprocédés, vu l'impact des phénomènes de transfert, la puissance volumique (en W/m<sup>3</sup>) est souvent considérée comme invariant. Les critères d'extrapolation utilisés en pratique au niveau industriel sont les suivants : puissance volumique constante (30% d'utilisation), coefficient de transfert d'oxygène constant (30%), vitesse périphérique  $\pi.N.d$  constante afin de limiter les stress liés au cisaillement (20%), concentration en oxygène dissous constante (20%) (Garcia-Ochoa, 2009).

### 3.2. Problèmes associés à l'intensification des transferts gaz-liquide

L'oxygène est très peu soluble dans les milieux aqueux, la concentration à saturation dans le liquide étant d'environ 8 mg/L dans les conditions usuelles de bioprocédé. Le bioréacteur doit donc être dimensionné de manière à maximiser la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gazeuse vers la phase liquide. Cette vitesse de transfert peut être caractérisée par la relation suivante :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_{La} \cdot (C_L^0 - C_L)$$

Où le  $K_{La}$  est le coefficient volumique de transfert d'oxygène (s<sup>-1</sup>),  $C_L$  la concentration en oxygène dissous au temps  $t$  et  $C_L^0$  la concentration en oxygène dissous à saturation (mg/L). Le coefficient  $K_{La}$  peut être facilement mesuré et est souvent considéré comme critère de performance pour caractériser l'efficacité de transfert d'oxygène des bioréacteurs (Garcia-Ochoa, 2009).

L'intensification du  $K_{La}$  est effectuée en augmentant la vitesse d'agitation et le débit d'air selon des proportions bien définies afin d'éviter le phénomène d'engorgement des mobiles

d'agitation par les cavités gazeuses (Nienow A.W., 1998). D'autres solutions peuvent également être envisagées, comme par exemple l'augmentation de la pression interne du réacteur afin d'améliorer la solubilité de l'oxygène dans le milieu aqueux, ou encore l'enrichissement de l'air injecté dans le réacteur par de l'oxygène pur.

Un problème technologique majeur des processus aérobies intensifs est la formation de mousses (Delvigne, 2010; Van't Riet K., 1992; Vardar-Sukan F., 1998). La présence de protéines ou de biosurfactants dans le milieu réactionnel tend à stabiliser la dispersion gaz-liquide au niveau de l'espace de tête du réacteur (Van't Riet K., 1992). Le moussage du milieu de culture peut entraîner le débordement du réacteur, ce qui induit des problèmes de perte de produits et de contamination. De nombreux progrès ont été envisagés à ce niveau, comme le réglage des conditions d'agitation et d'aération pour limiter la formation de mousse tout en gardant une capacité de transfert d'oxygène optimale (Hoeks, 2003), la conception de nouveaux antimousses chimiques (Etoc, 2006) ou encore la conception de capteurs dédiés à la détection de l'intensité du phénomène de moussage (Varley, 2004). Malgré ces efforts entrepris, la formation de mousses reste un problème technologique majeur dans la mise en œuvre des bioréacteurs.

#### **4. Deuxième niveau de dimensionnement des bioréacteurs: mesure et contrôle en ligne des paramètres environnementaux**

Les bioréacteurs sont équipés de systèmes de régulation très performants qui permettent de maintenir des conditions de culture à un niveau constant. Ceux-ci comprennent un couple senseur (une sonde qui mesure un paramètre donné, comme le pH ou la température) - actuateur (un système qui permet d'ajuster la valeur du paramètre mesuré, comme par exemple une pompe d'injection de base ou d'acide pour la régulation du pH). Les deux composants sont reliés par une boucle de régulation. Une stratégie d'extrapolation peut donc être de mettre en évidence les paramètres physico-chimiques critiques pour le procédé et de

les maintenir à un niveau constant. Le système de régulation peut en effet être facilement transposé à l'échelle industrielle. Les paragraphes qui suivent présentent la mise en place des boucles de régulation classiquement retrouvées au niveau des bioréacteurs ainsi que leur limitation lors de l'extrapolation des bioprocédés.

#### **4.1. Régulation du pH, de la température, de l'oxygène dissous et du niveau de substrat dans le volume réactionnel**

Les systèmes de régulation standards équipant les bioréacteurs font intervenir une boucle de régulation pour le pH et une boucle de régulation pour la température. Ces deux paramètres sont relativement bien maîtrisés dans les bioréacteurs actuels. Un autre paramètre crucial lors d'une culture de micro-organisme est le niveau de substrat carboné disponible pour la croissance et/ou la production de métabolites. En effet, celui-ci conditionne directement la vitesse de réaction microbienne. Dans certains cas, les excès de source de carbone sont indésirables car ils entraînent la formation de sous-produits. C'est le cas par exemple de la levure *S. cerevisiae*, pour laquelle un excès en glucose entraîne la formation d'éthanol en condition aérobie par un schéma réactionnel appelé effet glucose. Dans ce cas, le niveau de glucose doit être maintenu à un niveau très bas tout au long de la culture par un apport progressif de type *fed-batch*. La levure *Y. lipolytica* n'est pas sensible à l'effet glucose. Néanmoins, des résultats expérimentaux ont montré que la synthèse de lipases est induite lorsque la source de carbone hydrophobe devient limitante dans le milieu de culture (Fickers P., 2004). Ce phénomène d'induction résulte d'une adaptation de la levure à une disponibilité très faible en substrat. Dans cette optique, une régulation *fed-batch* de l'apport en substrat peut être envisagée afin de maximiser le rendement en lipase. Une telle approche a été envisagée en séparant une phase de croissance de la biomasse sur glucose suivie par une phase de production de lipase sur méthyloléate (Turki, 2009, 2010). Un autre paramètre environnemental critique pour la production de lipase par *Yarrowia lipolytica* est le taux d'oxygène dissous présent dans le volume réactionnel. En effet, *Y. lipolytica* est un micro-

organisme aérobie strict et il a été montré que l'hypoxie a un effet négatif sur le rendement spécifique, mais aussi sur le niveau d'expression du gène *lip2* responsable de la synthèse de la lipase extracellulaire (Kar, 2008). Malgré les nombreuses possibilités offertes au niveau de la régulation du taux d'oxygène dissous (modulation de la vitesse d'agitation et du débit d'air, enrichissement des gaz d'entrée en oxygène,...), aucune de ces stratégies n'a été envisagée de manière concrète pour la régulation du procédé de production de lipase.

#### **4.2. La diminution de l'efficacité de mélange lors de l'extrapolation : cause majeure de perte de rendement des bioprocédés ?**

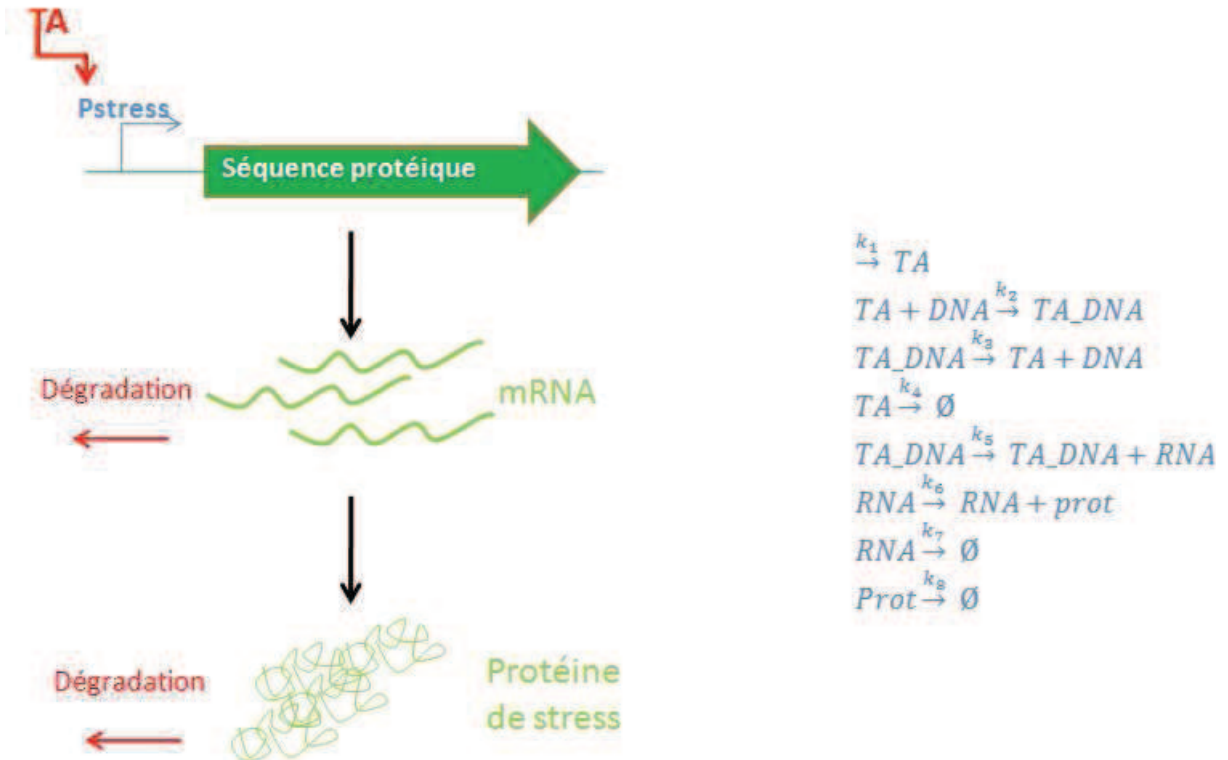
Les systèmes de régulation actuels sont basés sur des boucles de contrôle mettant en œuvre un capteur et un actionneur. Ces deux systèmes sont physiquement séparés au niveau du volume réactionnel. De plus, la zone de surveillance du capteur est limitée à une portion relativement faible du volume réactionnel. Pour des bioréacteurs de petit volume montrant un comportement dynamique proche du réacteur parfaitement agité, ces limitations n'ont pas de conséquences. Par contre, pour les bioréacteurs industriels, dont les temps de mélange peuvent atteindre plusieurs centaines de secondes (Delvigne, 2006), cette méthodologie de régulation pose des problèmes de temps mort entre la mesure du paramètre environnemental par le capteur et sa régulation par l'actionneur. Dans ce cas, une méthodologie de régulation de type "boucle ouverte", c'est-à-dire pour laquelle l'actionneur est actionné sur base d'une équation prédéfinie par l'opérateur, est préférée. Ces problèmes de transposition des systèmes de régulation à l'échelle industrielle ont un impact négatif sur la cinétique globale du procédé avec une réduction du rendement en biomasse et/ou en métabolites. D'un autre côté, plusieurs études ont montré que, outre la perte de rendement globale, l'apparition d'hétérogénéité au sein des réacteurs peut avoir des conséquences bénéfiques au niveau de la physiologie des micro-organismes (Patnaik, 2002). Une amélioration de la viabilité cellulaire a ainsi pu être mise en évidence lors du passage à l'échelle industrielle d'un procédé *fed-batch* de production de *Escherichia coli* (Hewitt, 2000).



## **5. Troisième niveau de dimensionnement des bioréacteurs: estimation du stress microbien face aux conditions de procédés**

### **5.1. Stress environnementaux rencontrés dans les bioprocédés : nature, échelle spatiale et temporelle**

La notion de stress n'est pas bien définie au niveau des micro-organismes. Une notion généralement acceptée de stress microbien est une adaptation du métabolisme et de la cinétique de croissance suite à un changement environnemental (choc osmotique, thermique, manque en source de carbone,...). La capacité de réponse aux conditions stressantes est très importante à prendre en compte afin de prédire le comportement des souches de levures en bioréacteur. En effet, l'intensité des perturbations, mais aussi leur fréquence affectent la dynamique de la réponse microbienne face au stress (Reijenga K.A., 2005). Les fluctuations en oxygène dissous, en substrat et en pH décrites dans le paragraphe précédent sont donc potentiellement impliquées dans la génération du stress microbien. La complexité du phénomène de réponse au stress réside dans la multiplicité des temps caractéristiques mises en jeu. Ceux-ci sont schématisés à la figure 3 par la cascade de réponse ADN, ARN, protéine. Cette figure montre que le promoteur de stress ( $P_{stress}$ ) est induit suite à l'interaction avec un facteur de transcription (TA). Dans ce cas, la cascade ou le réseau de régulation qui entraîne la synthèse de ce facteur de transcription a été ignorée par souci de simplicité. Le complexe TA\_DNA formé est responsable de la synthèse des ARN messagers correspondant (processus de transcription). Ces ARN messagers permettent alors la synthèse d'une protéine (processus de traduction). Cette protéine peut être une enzyme intervenant dans le métabolisme, une chaperone ou encore un facteur de transcription. Plusieurs études ont montrés que certains gènes pouvaient de cette manière être considérés comme indicateurs du stress encourus par les micro-organismes lors de la culture en bioréacteur (Pioch, 2007; Schweder, 1999, 2002, 2004).



**Figure 3 :** modélisation de la cascade de réactions mises en jeu dans la réponse au stress d'un micro-organisme : activation d'un promoteur de stress ( $P_{stress}$ ) conduisant à la synthèse d'une protéine

Selon ce modèle simplifié, la synthèse de la protéine de stress est soumise à un schéma faisant intervenir 8 réactions (caractérisées par le taux de réactions allant de  $k_1$  à  $k_8$ ) représentant la dynamique des 5 espèces biochimiques mises en jeu ( $TA$ ,  $DNA$ ,  $TA\_DNA$ ,  $RNA$  et  $GFP$ ). La valeur de ces différents taux reflète bien la multiplicité des échelles de temps mises en jeu dans les processus physiologiques. A titre d'exemple, le temps de demi-vie d'une protéine très soluble dans le cytoplasme excède les 24 heures, alors que celui de certains ARN messagers n'excède pas 1 à 2 minutes. La dynamique de réaction peut donc être représentée mathématiquement par un modèle comprenant 5 équations différentielles ordinaires :

$$\frac{dTA}{dt} = k_1 - k_2 \cdot TA \cdot DNA - k_4 \cdot TA + k_3 \cdot TA\_DNA$$

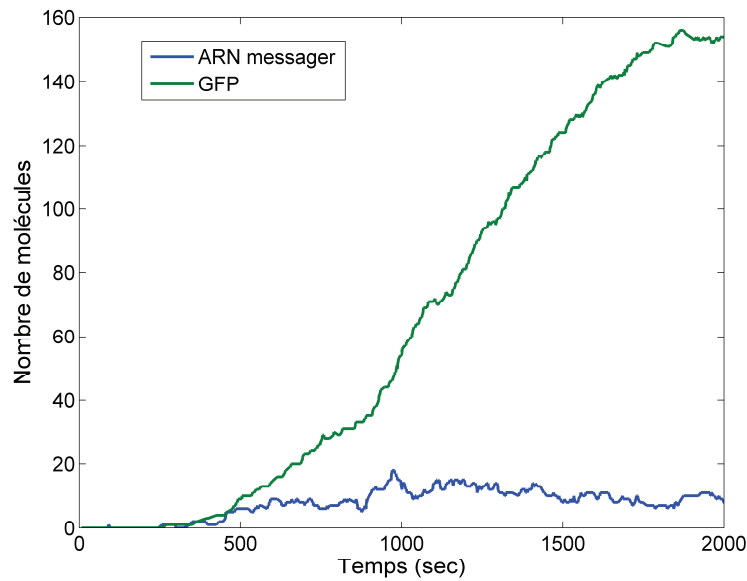
$$\frac{dTA\_DNA}{dt} = k_2 \cdot TA \cdot DNA - k_5 \cdot TA\_DNA - k_3 \cdot TA\_DNA$$

$$\frac{dDNA}{dt} = k_3.TA\_DNA - k_2.TA.DNA$$

$$\frac{dRNA}{dt} = k_5.TA\_DNA - k_6.RNA - k_7.RNA$$

$$\frac{dProt}{dt} = k_6.RNA - k_8.Prot$$

Ces équations peuvent être résolues numériquement par un algorithme adapté de manière à donner l'évolution de la concentration des 5 espèces au cours du temps. Néanmoins, il est maintenant évident que les processus biologiques à l'échelle cellulaire sont soumis à des phénomènes aléatoires ou stochastiques. Cette stochasticité peut être attribuée au nombre relativement restreint de molécules mise en jeu dans le volume cellulaire (MacAdams H.H., 1999; Patnaik P.R., 2006). Dans ce cas, il est plus réaliste d'envisager un algorithme de résolution des équations différentielles qui prend en compte la partie aléatoire (ou stochasticité) des processus de synthèse. Nous avons utilisé pour cela une version adaptée de l'algorithme de Gillespie (Gillespie D.T., 2001). Un exemple de simulation stochastique du modèle décrit à la figure 3 est montré à la figure 4.



**Figure 4** simulation de l'évolution du nombre de molécules d'ARN messager et de la protéine correspondante à l'échelle de la cellule microbienne. La simulation a été effectuée en utilisant l'algorithme stochastique de Gillespie

La difficulté à ce niveau est que le bruit associé à la synthèse de la protéine fluorescente dépend non seulement des fluctuations encourues au sein du bioréacteur, mais également des fluctuations intrinsèques liées à des processus biologiques (phase du cycle cellulaire, mutation,...)(Müller, 2010). Une alternative est la mise en place d'un protocole expérimental permettant de déterminer ce bruit au niveau de la synthèse protéique. A l'heure actuelle, la technique de cytométrie en flux est de plus en plus utilisée pour l'analyse des systèmes microbiens (Diaz, 2010; Tracy, 2010).

## **5.2. Application de la cytométrie en flux pour le suivi des bioprocédés**

La cytométrie en flux est de plus en plus considérée comme une méthode permettant d'obtenir des informations sur l'évolution des processus physiologiques dans le cadre des cultures microbiennes (Diaz, 2010). Conçue à l'origine pour l'étude des cellules eucaryotes supérieures, cette méthode est à l'heure actuelle de plus en plus considérée pour l'étude des micro-organismes. Cette technique est basée sur la séparation des cellules microbiennes à partir d'un échantillon par un processus de focalisation hydrodynamique. Chaque cellule individuelle est alors orientée vers un laser d'excitation. La séparation des différentes composantes de la lumière réfléchie permet de déterminer de nombreux paramètres cytologiques tels que la taille des cellules, leur forme et leur fluorescence si celles-ci ont été colorées avec un fluorochrome. Néanmoins, peu d'études mettent en œuvre la cytométrie en flux dans le cas de *Y. lipolytica*. Une des rares études dans ce domaine met en œuvre la cytométrie en flux afin de déterminer l'adhésion de microgouttelettes de substrat hydrophobe à la surface des membranes cellules de *Y. lipolytica* (Aguedo, 2003). Une approche innovante consiste à utiliser des systèmes de gènes rapporteurs sous le contrôle de promoteurs associés à des stress particuliers rencontrés dans les procédés. De cette manière, lorsque la cellule microbienne est soumise à un stress, la synthèse de protéines fluorescentes est induite et celles-ci s'accumulent à l'intérieur de la cellule. Le couplage de cette technique avec la

cytométrie en flux permet d'obtenir un signal proportionnel au stress à l'échelle de la cellule microbienne (Delvigne, 2009). Cette approche a récemment été appliquée au sein de notre équipe par la mise en œuvre d'un gène rapporteur de la synthèse de la lipase au niveau de *Y. lipolytica* (Kar, 2008).

## 6. Conclusion

Nous avons vu au cours de cet article que la réactivité au sein du bioréacteur est contrôlée par les conditions physico-chimiques régnant au sein du volume réactionnel, mais aussi par la réponse physiologique des micro-organismes cultivés. Si les premières conditions sont relativement bien maîtrisées à l'heure actuelle (existence de code de calcul de type mécanique des fluides numérique permettant de prédire les caractéristiques des écoulements dans le bioréacteur), il n'en va pas de même pour les secondes. En effet, la réponse microbienne face aux conditions de stress en procédé est complexe et fait intervenir de nombreuses échelles de temps. Afin d'effectuer une opération d'extrapolation, il est donc important de prendre en compte à la fois les paramètres du génie chimique pour le dimensionnement du bioréacteur, mais également de tenir compte des réponses physiologiques potentielles des micro-organismes cultivés. Ces réponses sont complexes et leur dynamique fait intervenir de nombreuses échelles temporelles et spatiales. La complexité des phénomènes de réponse physiologique peut à l'heure actuelle être caractérisée par la biologie systémique, c'est-à-dire l'étude de l'arrangement des gènes, protéines et métabolites en réseaux (génome, protéome et métabolome). A ce jour, de nombreux efforts ont été effectués pour comprendre et maîtriser la réponse microbienne face aux conditions de procédé, notamment en intégrant les données de la biologie systémique (Deckwer, 2006; Wang, 2009), et une nouvelle discipline, la fluxomique (la maîtrise des flux métaboliques), à même été développée dans ce contexte. Nous en sommes maintenant à considérer des modifications génétiques visant à diminuer la sensibilité des micro-organismes aux conditions de culture. Certains micro-organismes, tel

que *E. coli*, ont même été "reconstruits" avec des simplifications conséquentes de leur génome afin d'éliminer leurs mécanismes de réponse au stress. Dans le cas de *Yarrowia lipolytica*, seules des délétions ponctuelles ont été envisagées au niveau des systèmes de synthèse de protéases afin d'améliorer le niveau d'activité de la lipase LIP2 retrouvé dans le surnageant de culture (Fickers P., 2005a). Néanmoins, le séquençage complet du génome de ce micro-organisme devrait conduire sous peu à des remodelages plus conséquents du système de synthèse et d'excrétion de la lipase. Comme souligné par (Neubauer, 2010), il est curieux de noter que, malgré les progrès effectués au niveau de la compréhension des mécanismes biologiques, rien n'a été encore envisagé au niveau de la modification de la géométrie globale et des systèmes de régulation des bioréacteurs afin de mieux répondre aux contraintes imposées par la biologie des micro-organismes.

## 7. Références bibliographiques

- Aguedo, M., Waché, Y., Mazoyer, V., Sequeira-Le Grand, A., Belin, J.M., . 2003. Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. ***Journal of agricultural and food chemistry***, 51: 3007-3011.
- Beopoulos, A., Cescut., J., Haddouche, R., Uribe-larrea, J.L., Molina-Jouve, C., Nicaud, J.M., . 2009a. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. ***Progress in lipid research***, 48: 375-387.
- Beopoulos, A., Chardot, T., Nicaud, J.M., 2009b. *Yarrowia lipolytica* : a model and tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. ***Biochimie***, 91: 692-696.
- Charles, M., Wilson, J., . 2010. Fermenter design. In Wiley (Ed.), ***Encyclopedia of industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technology***, Vol. 7.
- Deckwer, W. D., Jahn, D., Hempel, D., Zeng, A.P.,. 2006. Systems biology approaches to bioprocess development. ***Engineering in life sciences***, 6(5): 455-469.
- Delvigne, F., Boxus, M., Ingels, S., Thonart, P.,. 2009. Bioreactor mixing efficiency modulates the activity of a prpoS::GFP reporter gene in *E. coli*. ***Microbial cell factories***, 8: 15.
- Delvigne, F., Destain, J., Thonart, P.,. 2006. A methodology for the design of scale-down bioreactors by the use of mixing and circulation stochastic models. ***Biochemical engineering journal***, 28(3): 256-268.
- Delvigne, F., Lecomte, J.P.,. 2010. Foam formation and control in bioreactors, ***Encyclopedia on industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technologies***: in press: Wiley.
- Destain J., F. P., Weeckers F., Moreau B., Thonart P. 2005. Utilization of methylcelate in production of microbial lipase. ***Applied biochemistry and biotechnology***, 121-124: 269-278.

- Destain J., R. D., Thonart P. 1997. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology letters**, 19(2): 105-107.
- Diaz, M., Herrero, M., Garcia, L.A., Quiros, C.,. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical engineering journal**, 48: 385-407.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., et al.,. 2004. Genome evolution in yeasts. **Nature**, 430: 35-44.
- Etoc, A., Delvigne, F., Lecomte, J.P., Thonart, P.,. 2006. Foam control in fermentation bioprocess : from simple aeration tests to bioreactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, 129-132: 392-404.
- Fickers P., B. P.-H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.-M. . 2005a. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications. **FEMS yeast research**, 5: 527–543.
- Fickers P., D. J., Thonart P. 2005b. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology letters**, 27: 1751-1754.
- Fickers P., N. J. M., Gaillardin C., Destain J., Thonart P. . 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of applied microbiology**, 96: 742–749.
- Fickers P., O., M., Destain, J., Weekers, F., Thonart, P., . 2006. Production and downstream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and microbial technology**, 38: 756-759.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., . 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes : an overview. **Biotechnology advances**, 27(2): 153-176.
- Gillespie D.T. 2001. Approximate accelerated stochastic simulation of chemically reacting systems. **Journal of chemical physics**, 115(4): 1716-1733.
- Herrera, J. R., Sentandreu, R., . 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. **Archives in microbiology**, 178: 477-483.
- Hewitt, C. J., Nebe-Von Caron, G., Axelsson, B., Mc Farlane, C.M., Nienow, A.W.,. 2000. Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry : effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. **Biotechnology and bioengineering**, 70(4): 381-390.
- Hewitt, C. J., Nienow, A.W.,. 2007. The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes, **Advances in applied microbiology**: 105-135: Vol. 62.
- Hoeks, F., Boon, LA, Studer, F, Wolff, MO, van der Schot, F, Vrabel, P, van der Lans, RGJM, Bujalski, W, Manelius, A, Blomsten, G, Hjorth, S, Prada, G, Luyben, KCAM, Nienow, AW,. 2003. Scale up of stirring as foam disruption (SAFD) to industrial scale **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, 30(2): 118-128
- Junker B.E. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. **Journal of bioscience and bioengineering**, 97(6): 347-364.
- Kaneshina, M., Goto, S.,. 2000. KEGG : kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acid research**, 28: 27-30.
- Kar, T., Delvigne, F., Masson, M., Destain, J., Thonart, P.,. 2008. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, 35: 1053-1059.
- Lopes, M., Gomes, N., Gonçalves, C., Coelho, M.A.Z., Mota, M., Belo, I.,. 2008. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. **Letters in applied microbiology**, 46: 255-260.
- MacAdams H.H., A. A. 1999. It's a noisy business. Genetic regulation at the nanomolar scale. **Trends in genetics**, 15(2): 65-69.



- Müller, S., Harms, H., Bley, T., 2010. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. *Current opinion in biotechnology*, 21: 100-113.
- Neubauer, P., Junne, S., 2010. Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Current opinion in biotechnology*, 21: 114-121.
- Nicaud, J. M., Madzak, C., van den Broek, P., Gysler, C., Duboc, P., Niederberger, P., Gaillardin, C., 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS yeast research*, 2: 371-379.
- Nienow A.W. 1998. Hydrodynamics of stirred bioreactors. *Applied mechanics review*, 51(1): 3-32.
- Palomares, L. A., Ramirez, O.T., 2010. Geometric considerations for bioreactor scale-up. In Wiley (Ed.), *Encyclopedia of industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technology*.
- Patnaik P.R. 2006. External, extrinsic and intrinsic noise in cellular systems : analogies and implications for protein synthesis. *Biotechnology and molecular biology review*, 1(4): 121-127.
- Patnaik, P. R. 2002. Can imperfections help to improve bioreactor performance ? *Trends in biotechnology*, 20(4): 135-137.
- Pereira-Meirelles, F. V., Rocha-Leao, M.H.M., Sant'Anna, G.L., 2000. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnology letters*, 22: 71-75.
- Pioch, D., Jürgen, B., Evers, S., Maurer, K.H., Hecker, M., Schweder, T., 2007. At-line monitoring of bioprocess-relevant marker genes. *Engineering in life sciences*, 7(4): 373-379.
- Reijenga K.A., B. B. M., van der Weijden C.C., Westerhoff H.V. 2005. Training of yeast cell dynamics. *FEBS journal*, 272: 1616-1624.
- Schweder, T., Hecker, M., 2004. Monitoring of stress responses. *Advances in biochemical engineering/Biotechnology*, 89: 47-71.
- Schweder, T., Krüger, E., Xu, B., Jürgen, B., Blomsten, G., Enfors, S.O., Hecker, M., 1999. Monitoring of genes that respond to process related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnology and bioengineering*, 65(2): 151-159.
- Schweder, T., Lin, H.Y., Jürgen, B., Breitenstein, A., Riemschneider, S., Khalameyzer, V., Gupta, A., Büttner, K., Neubauer, P. 2002. Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 58: 330-337.
- Szabo R., S. V. 2002. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS microbiology letters*, 206: 45-50.
- Tracy, B. P., Gaida, S.M., Papoutsakis, E.T., 2010. Flow cytometry for bacteria : enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Current opinion in biotechnology*, 21: 85-99.
- Turki, S., Ayed, A., Chalgoumi, N., Weekers, F., Thonart, P., Kallel, H., 2010. An enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(5).
- Turki, S., Ben Kraeim, I., Weekers, F., Thonart, P., Kallel, H., 2009. Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulates lipase production in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource technology*, 100(10): 2724-2731.
- Van't Riet K., v. S. H. M. 1992. Foaming, mass transfer and mixing : interrelations in large scale fermentors. In M. R. L. a. A. Bose (Ed.), *Harnessing biotechnology for the 21st century*: 189-192. Washington DC: American chemical society.



- Vardar-Sukan F. 1998. Foaming : consequences, prevention and destruction. *Biotechnology advances*, 16(5/6): 913-948.
- Varley, J., Brown, A.K., Boyd, J.W.R., Dodd, P.W., Gallagher, S.,. 2004. Dynamic multi-point measurement of foam behaviour for a continuous fermentation over a range of key process variables. *Biochemical engineering journal*, 20: 61-72.
- Wang, Y., Chu, J., Zhuang, Y., Wang, Y., Xia, J., Zhang, S.,. 2009. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. *Biotechnology advances*, 27: 989-995.
- Yu, M., Qin, S., Tan, T.,. 2007. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process biochemistry*, 42: 384-391.
- Zinjarde, S. S., Pant, A., Deshpande, M.V.,. 1998. Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. *Mycological research*, 102(5): 553-558.

## Chapitre II

---

# Impact de l'environnement extracellulaire des bioréacteurs sur la production de lipase

**Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :**

Kar T., Delvigne F., Masson M., Destain J., Thonart P. (2008). Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 1053-1059.

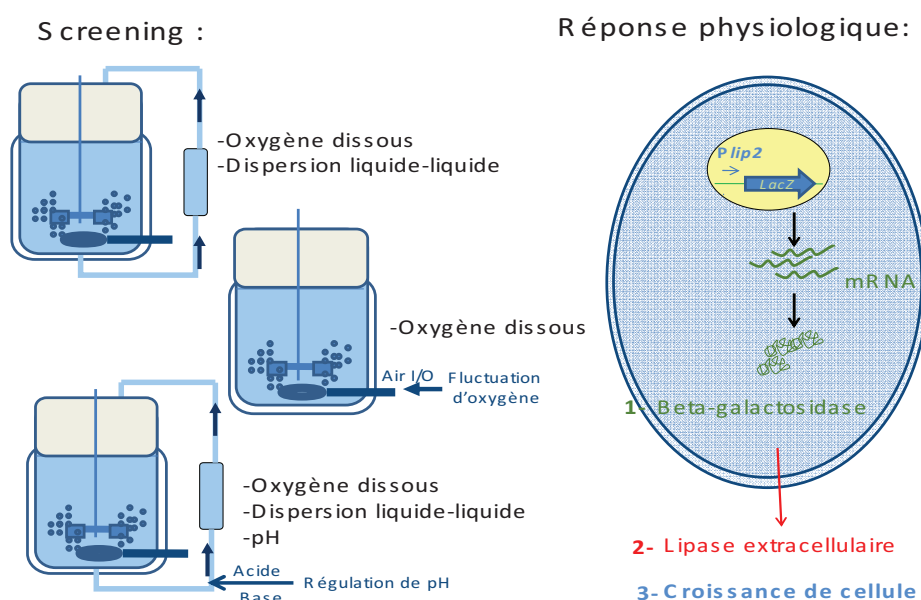
# Impact de l'environnement extracellulaire des bioréacteurs sur la production de lipase

## Résumé

### *Objectif et stratégie expérimental :*

L'objectif de ce premier travail visait à effectuer un criblage des facteurs extracellulaires susceptibles de présenter des hétérogénéités lors de l'extrapolation. L'influence de trois facteurs sur la production en batch de la lipase par *Y.lipolytica* ont été étudiés en utilisant différents types de bioréacteurs *scale-down*. Il s'agit de l'efficacité de dispersion du substrat hydrophobe utilisé pour induire la production de lipase, de la concentration en oxygène dissous et du pH. L'étude de la réponse physiologique est basée sur trois niveaux : l'activité de la lipase extracellulaire, la capacité cellulaire de production de lipase et la croissance des cellules.

Les principaux paramètres physiologiques observés au cours de ce travail sont repris de façon synoptique dans le schéma suivant :



**Figure 1 :** schémas des différents types de bioréacteurs *scale-down* utilisés pour reproduire les trois types des fluctuations environnementales et des trois niveaux de réponse physiologique étudiés.

## **Abstract**

The influence of three extracellular factors (namely, the methyl oleate dispersion in the broth, the dissolved oxygen variations and the pH fluctuation) on the lipase production by *Y. lipolytica* in batch bioreactor has been investigated in different scale-down apparatus. These systems allow to reproduce the hydrodynamic phenomena encountered in large-scale equipments for the three specified factors. The effects of the extracellular factors have been observed at three distinct levels: the microbial growth, the extracellular lipase production and the induction of the gene *lip2* encoding for the main lipase of *Y. lipolytica*. Among the set of the environmental factors investigated, the dissolved oxygen fluctuations generated in a controlled scale-down reactor (C-SDR) have led to the more pronounced physiological effect by decreasing the *lip2* gene expression level. The other environmental factors observed in a partitioned scale-down reactor, i.e. the methyl oleate dispersion and the pH fluctuations, have led to a less severe stress traduced only by a decrease of the microbial yield and thus of the extracellular lipase specific production rate.

**Keywords:** methyl oleate, *lip2* expression, oxygen transfer, heterogeneities, scale-up

## Introduction

*Yarrowia lipolytica* is a non conventional yeast that has been widely studied for its lipase production capacity. The lipase production is affected by several extracellular factors, such as the carbon source level, the pH, the dissolved oxygen level, the nitrogen source,...(Guerzoni M.E., 2001) At this time, some mechanisms at the level of the nutrient assimilation by *Y. lipolytica* cells remains incompletely understood (Fickers P., 2005a). However, there is also a lack at the level of the understanding of the scale-up effect on the microbial production of lipase. Indeed, the up-scaling procedure leads to an irremediable increase of the mixing time of the bioreactor. The direct consequence of this phenomena is the appearance of gradient and related mixing imperfections at large-scale (Enfors S.O., 2001). In this work, three extracellular parameters have been studied in a scaling-up perspective: the carbon source accessibility (methyl oleate has been used as a carbon source and must be efficiently dispersed in the aqueous culture media), the dissolved oxygen level and the pH fluctuations. These extracellular factors have been observed in a small-scale bioreactor (20 L) and in two distinct scale-down apparatus designed to reproduce the hydrodynamic phenomena occurring in large-scale bioreactors. The methyl oleate dispersion and the pH gradients have been studied in a partitioned bioreactor comprising a classical 20L bioreactor connected to a tubular part in which the mixing intensity is significantly altered compared to the stirred part. The oxygen level fluctuation has been studied in a controlled 20L bioreactor in which an automatic air injection valve is closed or open according to a specific algorithm. Three physiological parameters have been followed in front of these extracellular conditions: the microbial growth, the extracellular lipase level and the lip2 gene expression level (coding for the main lipase produced by *Y. lipolytica* and monitored in this work by a LIP2-lacZ reporter gene (Fickers P., 2004)).

## Material and methods

### Strain and culture conditions

*Yarrowia lipolytica* JMY775 is stored at -80°C in working seeds vials (cells in suspension in glycerol solution 40%). The JMY775 strain has been obtained by genetic manipulation from a lipase overproducing strain (LgX64.81 (Destain J., 1997)) modified with a LIP2-LacZ reporter gene (Fickers P., 2005b). Cells are first precultivated in a 250 mL baffled shake flask containing 100 mL of YPG medium at 30 °C for 24 h. A second precultivation step is then carried out during 24h in 2L baffled shaken flasks containing 750 mL of medium containing glucose (15g/L) ; whey powder (30g/L) (BHA, Belgium) ; corn steep (10g/L) (Roquette, France); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8g/L) (VWR , Belgium). After the precultivation steps, the culture is transferred in a 20L bioreactor (Biolaffite-France ; internal diameter : 0.22 m) with a working volume of 12 L and equipped with two RDT6 rushton turbines (d = 0.1 m). The cultivation media for the bioreactor has been optimized previously for the lipase production by *Y. lipolytica* (Destain J., 2005; Destain J., 1997) and contains per liter: methyl oleate, 25mL (Cognis, France).; whey powder, 30g; corn steep, 10g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8g. The regulation of the culture parameters (pH, temperature, etc.) is ensured by a direct control system (ABB). The culture in the bioreactor is carried out at 30 °C with a fixed stirring speed of 350 rpm and an air flow rate of 1 vvm (volume of air per volume of medium per minute. In our case 1 vvm corresponds to 12 L/min). The dissolved oxygen is continuously monitored with an oxygen probe (Mettler Toledo InPro 6800 series). The foam level in the reactor is monitored by an antifoam probe placed at 10 cm from the top of the vessel. The foam level is then controlled by the addition of antifoam Tego KS911 (Goldschmidt, Germany). The pH of the broth is measured with a pH probe (Mettler Toledo InPro 2000/120/Pt100/9848) and is regulated at a value of  $7 \pm 0.1$  by the addition of KOH 6N or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6N.

### **Analytical methods**

The microbial growth is monitored by a direct counting method on an haemocytometer (Bürker type ; 10 repetitions are performed for each estimation of the number of microbial cells per mL). The extracellular lipase activity is determined as follows: samples of the culture medium are withdrawn at various times of fermentation, centrifuged for 20 min at 10,000 g. The supernatant is then used for the extracellular lipase activity estimation by using an olive oil emulsion as the enzyme substrate (olive oil 25%, 0.1M NaOH 7.5%, polyvinyl alcohol (2%) 67.5%). The enzymatic reaction is initiated by adding 1mL of supernatant to 4mL of emulsion with 5mL of 0.1M of phosphate buffer at pH 7. The enzymatic reaction is maintained for 15 minutes at 37°C on a rotary shaker (150rpm) and is subsequently stopped by the addition 20 mL of acetone-ethanol mix (1:1[v/v]). The free fatty acids released during the reaction are then titrated with 0.05M NaOH (Destain, Fickers, Weekers, Moreau, & Thonart, 2005). One unit of lipase activity is defined as the amount of lipase inducing the release of 1mmol of fatty acid per minute at 37°C and pH 7. The expression of the lip2 gene is performed on the basis of the parallel synthesis of  $\beta$ -galactosidase by the LIP2-LacZ reporter gene JMY775 strain. The  $\beta$ -galactosidase activity, expressed in Miller unit, is defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu$ mole of o-nitrophenol (subsequent to the hydrolysis of the ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside ONPG) per minute and per unit of optical density (600nm) at 37°C. The  $\beta$ -galactosidase is extracted from the microbial cells by a chloroform permeabilization procedure as described previously (Fickers P., 2004).

### **Scale-down reactor strategies**

Three specific environmental factors having a potential impact at the level of the lipase production in large-scale bioreactors have been investigated: the dispersion efficiency of the hydrophobic substrate used to cultivate *Y. lipolytica* (methyl oleate), the dissolved oxygen fluctuations and the pH gradients. In order to limit the scale of the experimental apparatus, several scale-down reactors have been designed to reproduce the environmental behavior of

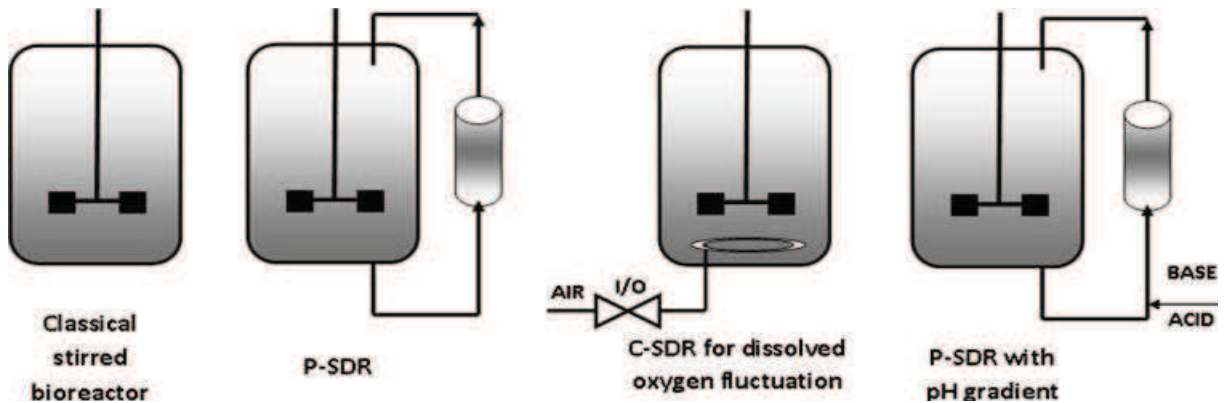
each factor in laboratory conditions. The different reactor configurations are briefly presented at figure 1. The P-SDR comprises a classical 20L bioreactor connected to a glass bulb (length: 0.25 m ; internal diameter : 85 mm). The connections between the two parts of the P-SDR are made of norprene tubing (masterflex). Norprene has been chosen for its low oxygen permeability and for its high mechanical resistance. The P-SDR has been used by numerous authors in order to study the influence of the scale-up procedure on the microbial physiology (Enfors S.O., 2001; Hewitt C.J., 2007; Lara A.R., 2006; Neubauer P., 1995). In our case, the P-SDR has been used to observe the impact of the methyl oleate dispersion efficiency and the pH gradient formation at different physiological levels. Indeed, the nonmixed part connected to the classical stirred reactor exhibits lower hydrodynamic efficiency, leading to an alteration of the methyl oleate dispersion (or in other words, an alteration of the substrate accessibility) and to the formation of concentration gradients. The intensity of the concentration gradient and/or the residence time of the cells inside the nonmixed part of the P-SDR can be modified by varying the recirculation flow rate of the pump. Three recirculation flow rates have been investigated, i.e. 480, 360 and 240 ml/min, leading respectively to a mean residence time inside the nonmixed part of 2.5, 3.3 and 5 minutes. In a second time, the effect of the dissolved oxygen depletion occurring in the nonmixed part of the P-SDR has been isolated by using a fundamentally different scale-down strategy relying on the control of the air admission valve. This kind of controlled scale-down reactor (C-SDR) has been previously developed to specifically observe the impact of the dissolved oxygen fluctuations on the microbial physiology (Namdev P.K., 1991). In our case, the on/off regulation scheme for the air admission valve has been computed firstly from the mean residence time inside the different parts of the P-SDR, and secondly from a stochastic model reproducing the circulation of the microbial cells inside the P-SDR. This model is used in the context of this work to simulate the displacement of several microbial cells from the mixed to the nonmixed



part of a P-SDR. The two parts of the reactor are modeled as distinct compartments or states in the context of the model. The microbial cells are allowed to switch to a state to another according to the probability:

$$P = \frac{Q_{\text{recirc}}}{V} \cdot \Delta t$$

With  $Q_{\text{recirc}}$  being the recirculation flow rate (ml/s),  $V$  being the volume of the considered state (part) of the P-SDR (ml) and  $\Delta t$  being the simulation time interval (s). In our case, we have performed discrete simulation with a constant time interval of 1 second. On the basis of the computed probabilities, a Monte Carlo simulation of the displacement of the microbial cells from a state to another has been performed. The simulated displacement profile allows the computation of the respective residence time of each microbial cell in the different parts of the reactor. These residence time distributions are then used to control the air admission valve at the level of the C-SDR, by considering that the ‘on’ state corresponds to the passage of the cells at the level of the mixed part of the reactor and the ‘off’ state corresponds to the passage of the cell at the level of the nonmixed part.



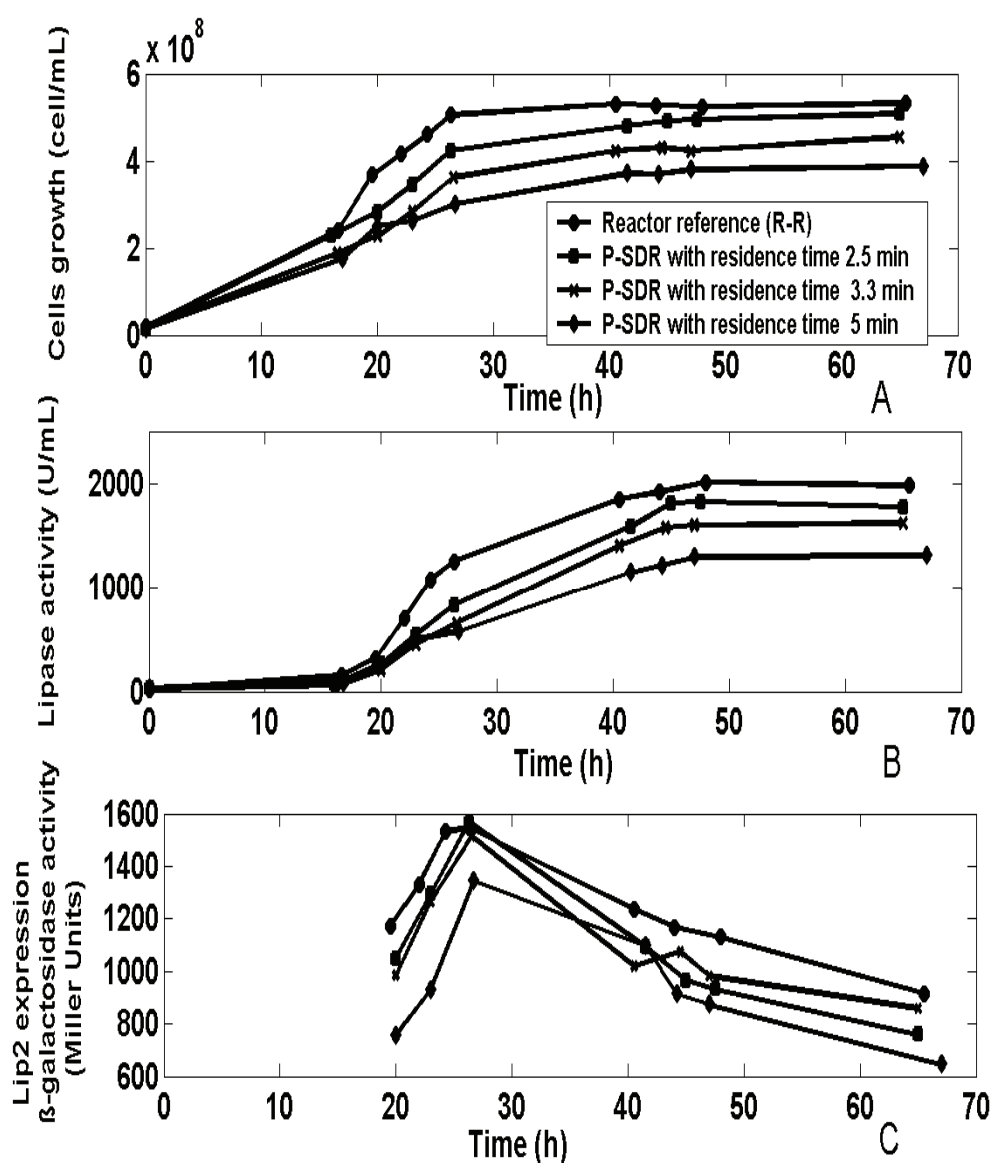
**Figure 1 :** scheme of the different reactor configurations used in this work. From left to right : classical stirred bioreactor in which the reference cultures are performed ; partitioned scale-down reactor (P-SDR) designed to observe the impact of the drop of the methyl oleate dispersion efficiency at the level of the nonmixed part ; controlled scale-down reactor (C-SDR) with an electrical air admission valve used to reproduce the dissolved oxygen fluctuations encountered in large-scale bioreactors ; P-SDR with the pH regulation performed at the level of the nonmixed part in order to promote pH gradients formation

## Results and discussion

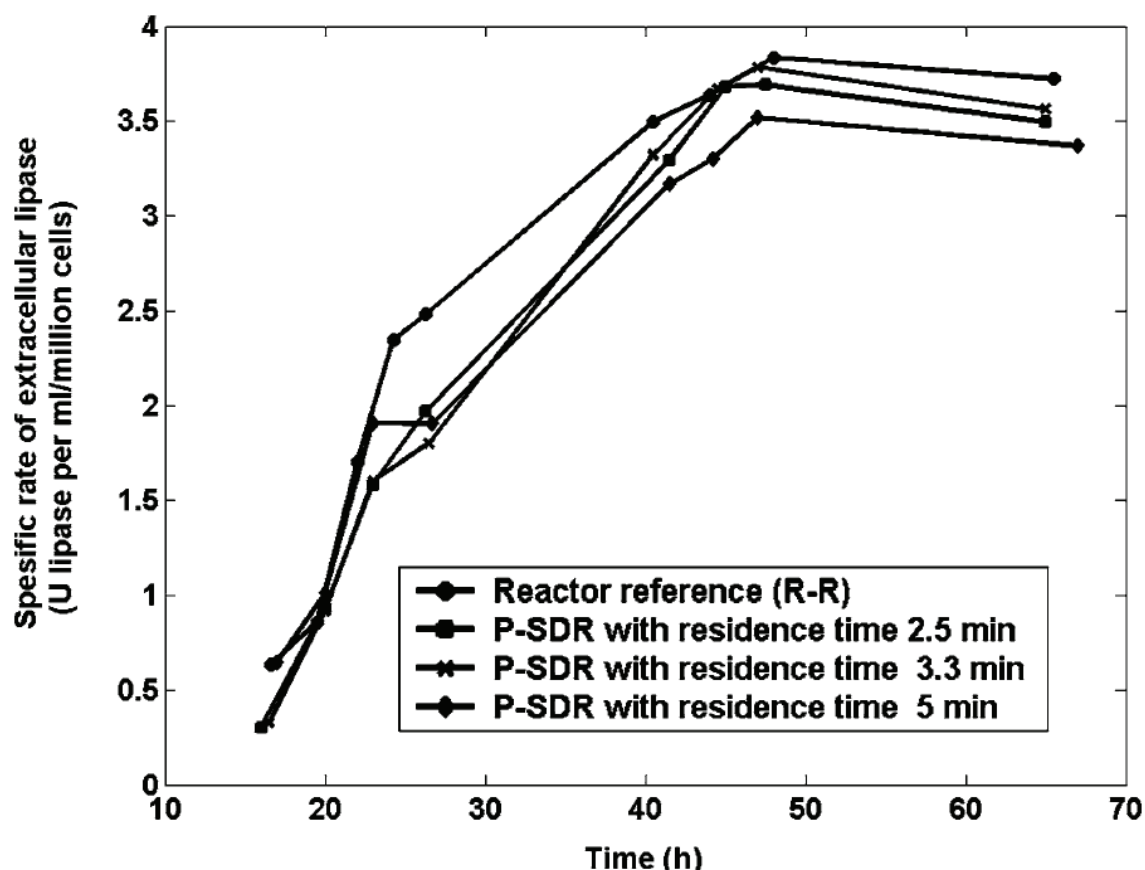
### **Effect of the methyloleate and dissolved oxygen availability: involvement of a partitioned scale-down reactor (P-SDR)**

The first set of experiments has been performed by cultivating *Y. lipolytica* in a 20L bioreactor and in a partitioned scale-down reactor. The P-SDR has been designed to reproduce the passage of the microorganisms from a well-mixed zone to an imperfectly mixed zone, a phenomena occurring in large-scale bioreactors. The imperfectly mixed zone has been designed by positioning a tubular part at the outlet of the 20L stirred bioreactor. Figure 2a shows a significant decrease of the cell growth correlated directly to a drop of extracellular lipase activity. However the *lip2* gene expression monitored by measuring the beta-galactosidase activity is not altered by the scale-down strategy (figure 2c), except in the case of the lower recirculation flow rate for which the mixing efficiency of the SDR is very low. This means that the intracellular lipase synthesis process is not affected by the modulation of the mixing efficiency of the P-SDR, with an exception to be mentioned for the lowest recirculation flow rate (corresponding to the higher mean residence time in the nonmixed part of the P-SDR). From these result, it can be concluded that modulating the recirculation flow rate of the P-SDR, i.e. modifying the residence time of the microorganisms in a badly mixed environment, has a direct impact on cell growth and on the total lipase content of the broth (the specific lipase production is not affected as shown at figure 3). In the case of the P-SDR with the lowest mixing efficiency, i.e. with the microorganisms being exposed more frequently to bad mixing conditions, the intracellular lipase synthesis is affected, as shown by the reporter gene analysis. Two environmental factors are potentially involved in the scale-down effect at the level of the P-SDR. The first one is the drop at the level of the shear forces in the nonmixed part of the P-SDR, by comparison with the mixed one where the rushton disk turbines ensure an efficient dispersion of the methyl oleate. This drop at the level of the methyl oleate dispersion efficiency limits the substrate accessibility and is potentially

detrimental for the lipase production. The second environmental factor is the diminution of the oxygen transfer efficiency at the level of the nonmixed part of the P-SDR. Indeed, the dissolved oxygen constitutes another important substrate for the optimal cell growth and for the lipase production. However, at this stage, the respective effects of the methyl oleate dispersion and the dissolved oxygen availability cannot be distinguished. In the next section, a second scale-down reactor has been designed in order to isolate the effect of the dissolved oxygen fluctuations on the lipase production by *Y. lipolytica*.



**Figure 2 :** evolution of the amount of microbial cells (a), the extracellular lipase activity (b) and the lip2 expression (c) in function of the reactor configuration

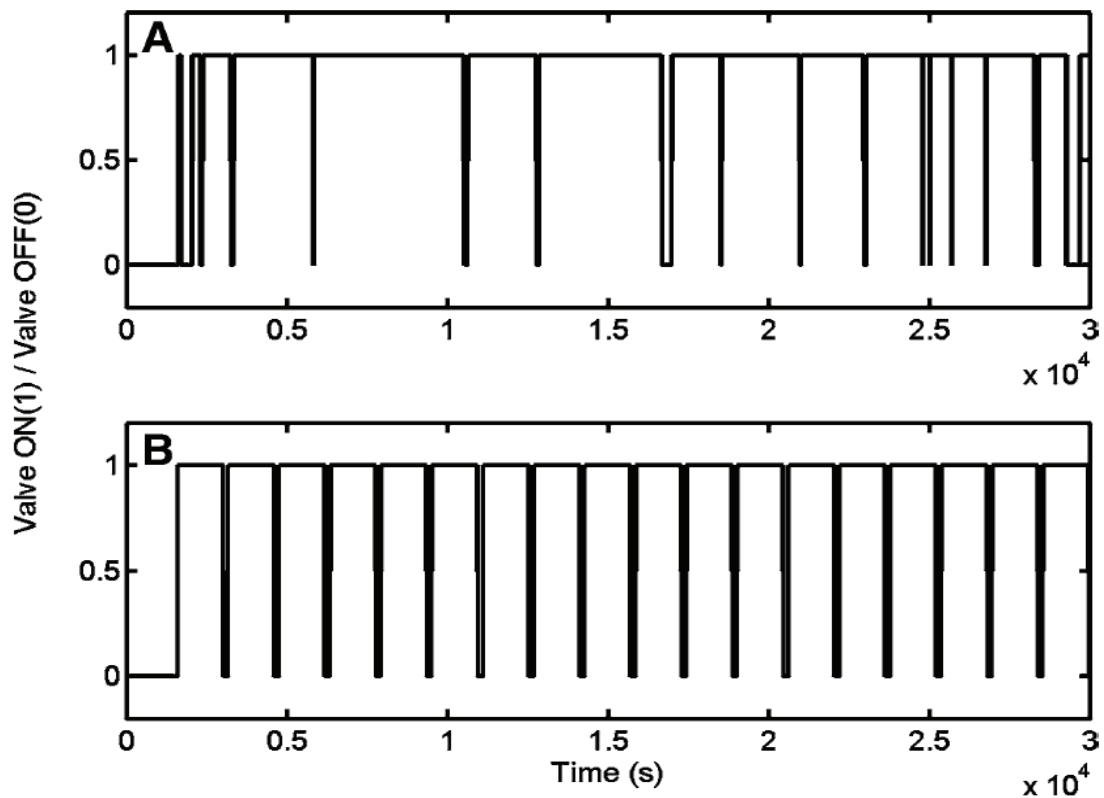


**Figure 3 :** specific rate for the extracellular lipase production by *Y. lipolytica* cultivated in a classical 20L bioreactor (reference reactor) and in a P-SDR under different recirculation flow rates (corresponding each to a mean residence time in the nonmixed part of the reactor)

#### Effect of the dissolved oxygen level fluctuations: involvement of a controlled scale-down reactor (C-SDR)

In order to isolate the respective effect of the dissolved oxygen fluctuation, a controlled SDR has been designed (Figure 1). In the C-SDR, the air flow rate is sequentially closed and opened by an electric valve controlled by a specific algorithm in order to reproduce the oxygen transfer fluctuations occurring in the corresponding P-SDR when the cells are crossing the non aerated nonmixed part of this reactor. Two kinds of control algorithm have been tested. The first control algorithm imposes regular on/off cycles to the air admission valve of the C-SDR. The time lengths of the on and the off cycle are based on the respective residence time inside the mixed (where the broth is well aerated) and inside the nonmixed (where the broth is badly aerated) parts of the reactor, the goal being to isolate the effect of

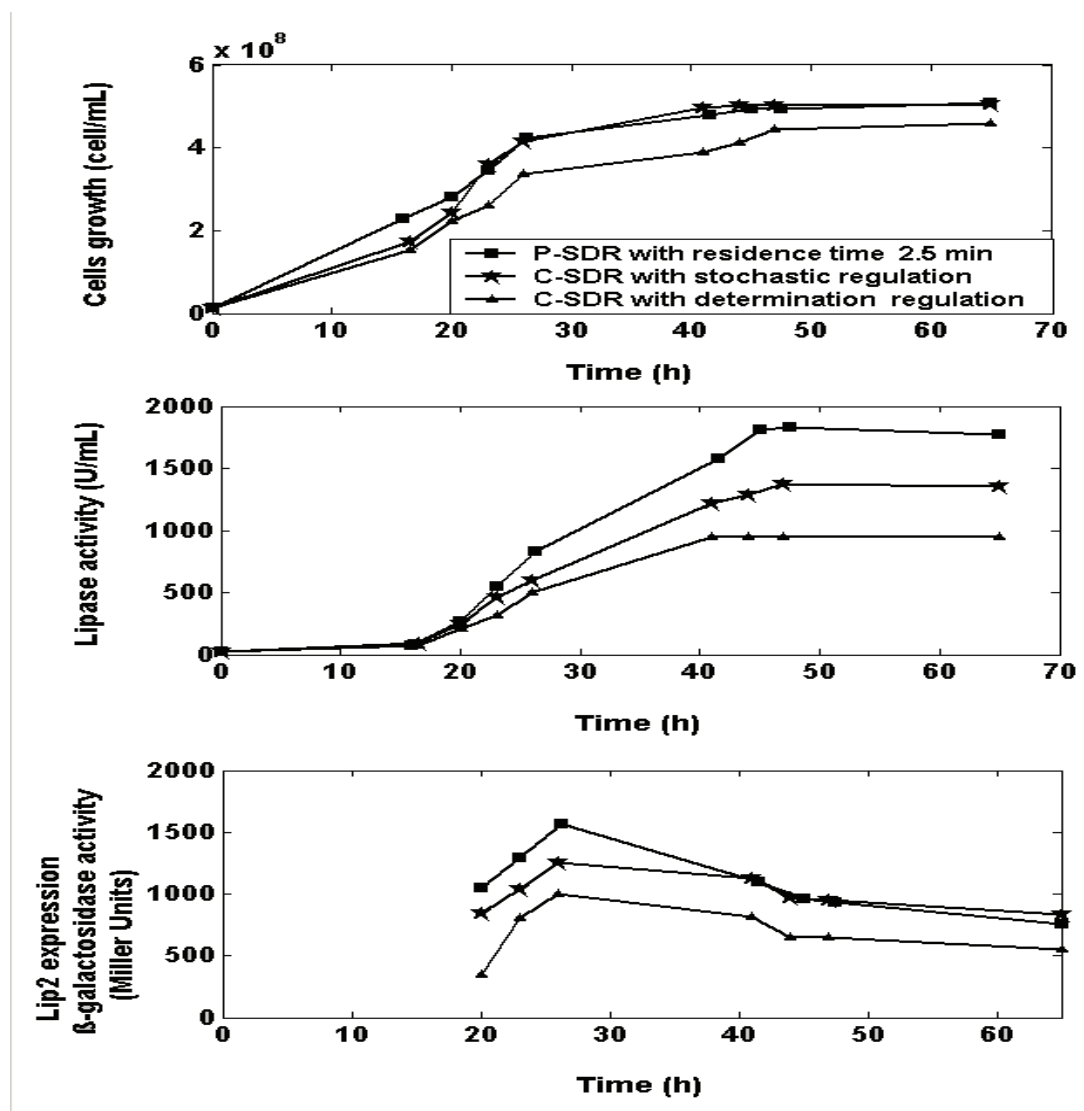
the dissolved oxygen fluctuation by comparison with the results obtained in the previous section. However, previous hydrodynamic results have shown that the passage of the cells from the mixed to the nonmixed part of the P-SDR is strongly stochastic (Delvigne F., 2006a). In order to take into account this important feature, a second air valve control algorithm has been elaborated on the basis of a two-compartment stochastic hydrodynamic model developed in our laboratory (Delvigne F., 2006b). Samples of the two controlling schemes are shown at figure 4. Figure 4 shows that air admission valve on/off cycles based on the direct consideration of the mean residence time inside the different parts of the P-SDR (figure 4b) tends to overestimate the stress by comparison with the on/off scheme computed from the stochastic model (figure 4a).



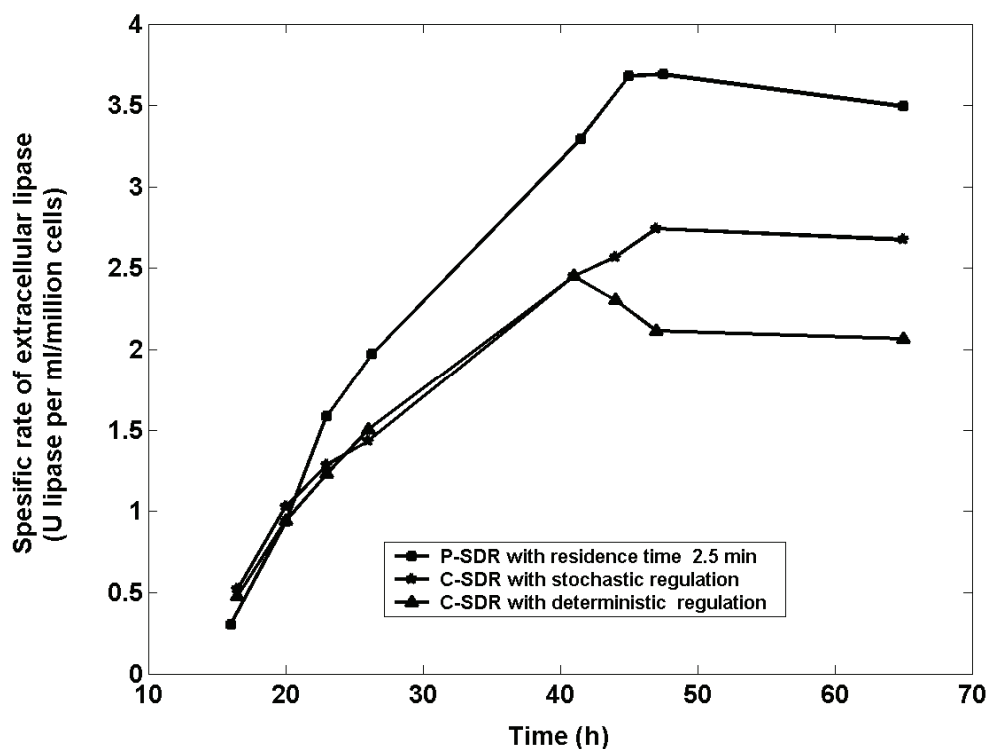
**Figure 4 :** on/off cycle scheme for the C-SDR (A : stochastic scheme ; B : constant cycles scheme)

This fact is confirmed by the microbial growth curves shown at figure 5a where the C-SDR with the cycling on/off scheme gives the lower biomass yield. On the other hand, the two C-

SDRs show a significant drop at the level of the extracellular lipase production, this drop being more pronounced in the case of the C-SDR with the regular on/off scheme (figure 4b), where the stress induced by the dissolved oxygen fluctuations is higher. On the opposite of the results shown in the previous section for the effect of the methyl oleate dispersion, the extracellular lipase yield drop cannot be exclusively attributed to the lower amount of biomass, as shown by the specific levels of lipase production (figure 6). Indeed, in the case of the dissolved oxygen fluctuations generated at the level of the C-SDRs, the stress has an impact at the level of the lip2 expression (figure 5c).



**Figure 5 :** evolution of the amount of microbial cells (a), the extracellular lipase activity (b) and the lip2 expression (c) in function of the reactor configuration



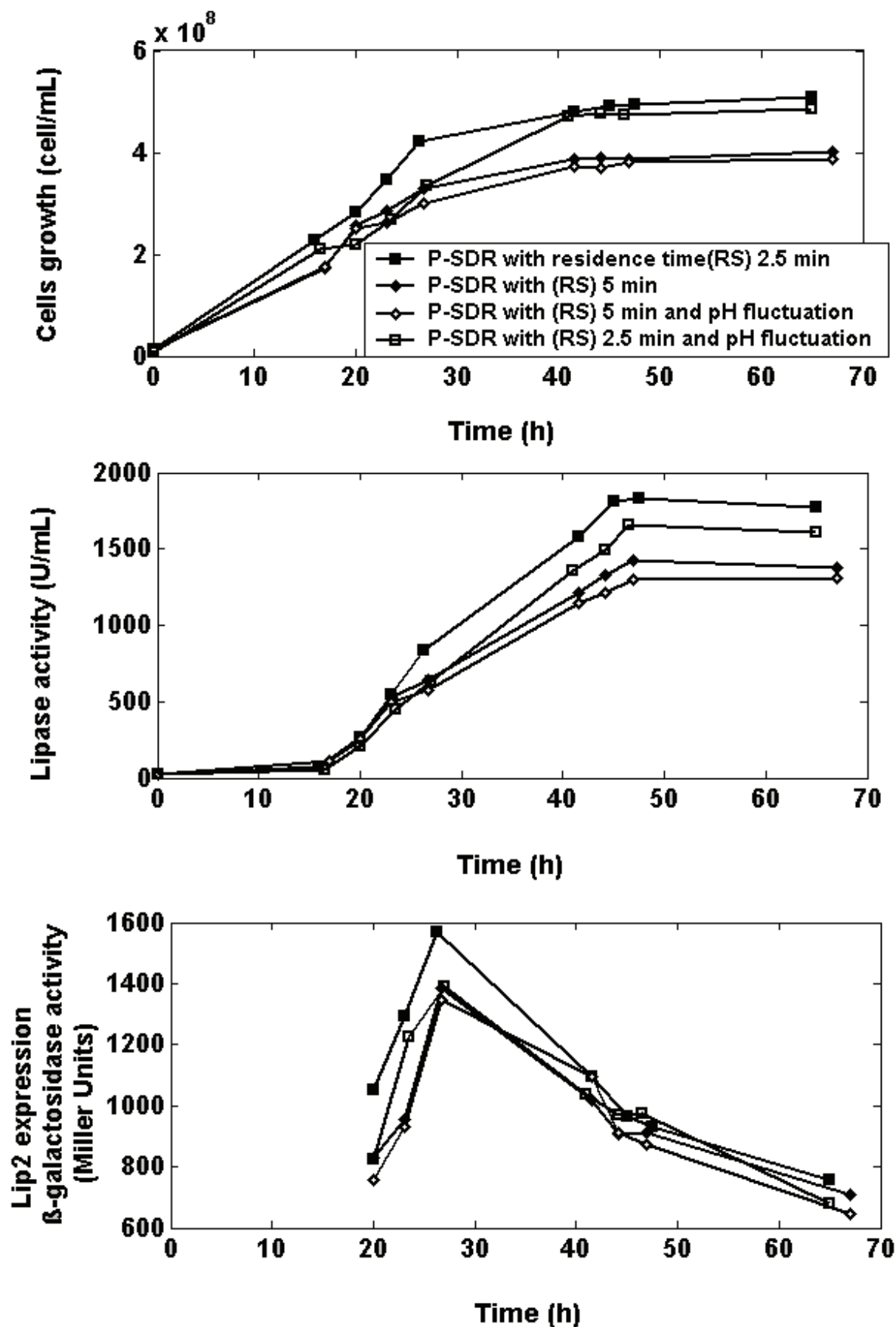
**Figure 6 :** specific rate for the extracellular lipase production by *Y. lipolytica* cultivated in different reactor configuration (see figure 1 for more details about these configurations)

#### **Effect of the pH local variations: involvement of a partitioned scale-down reactor (part-SDR)**

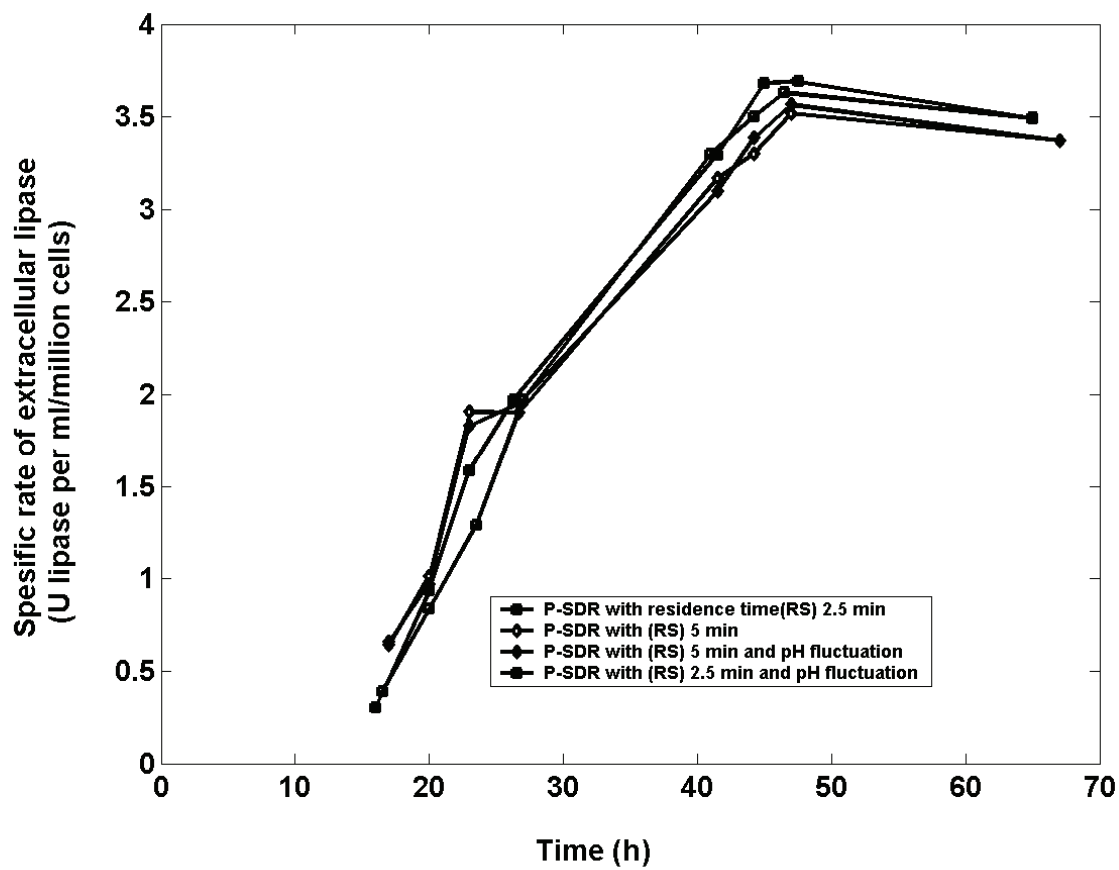
A third environmental factor potentially significant for the lipase production by *Y. lipolytica* in large-scale bioreactors is the pH gradient induced by the control systems. Indeed, the pH is typically regulated in bioreactor by adding base or acid at the top of the reactor and by recording the pH value with a probe located at the lower part of the reactor. The response time of the probe and the local action of the controller, as well as their physical separation at the level of the reacting volume, induces the development of pH gradients. In order to observe the effect of such gradient at small-scale, the previous P-SDR has been used. The pH gradient is generated by injecting the base or acid solution at the inlet of the nonmixed part of the P-SDR. The experiments have been conducted by comparing a culture performed in a P-SDR with a classical pH regulation performed at the level of the mixed part (in this case the pH gradient is rapidly attenuated by the mixing efficiency of the impeller) with a culture performed in a P-SDR with the pH regulation performed at the level of the nonmixed part of

the reactor (in this case the pH gradient is promoted by the plug-flow effect occurring in this part of the reactor). As shown at figure 7b, the extracellular lipase yield is slightly lower for the P-SDR with the pH regulation performed at the level of the nonmixed part in order to promote the gradient formation. This effect is more pronounced in the case of the P-SDR with the higher recirculation flow rate (residence time of 2.5 minutes). For this reactor, the beta-galactosidase assays (figure 7c) show clearly a drop at the level of the lip2 gene expression. No additional effect to the P-SDR has been observed when promoting pH gradients. However, a morphological modification of the cells has been observed when performing the pH regulation at the level of the nonmixed part of the reactor (figure 9). These results are in accordance with previously reported dimorphism manifestation of *Y. lipolytica* exposed to pH fluctuations (Ruiz-Herrera J., 2002; Szabo R., 2002).

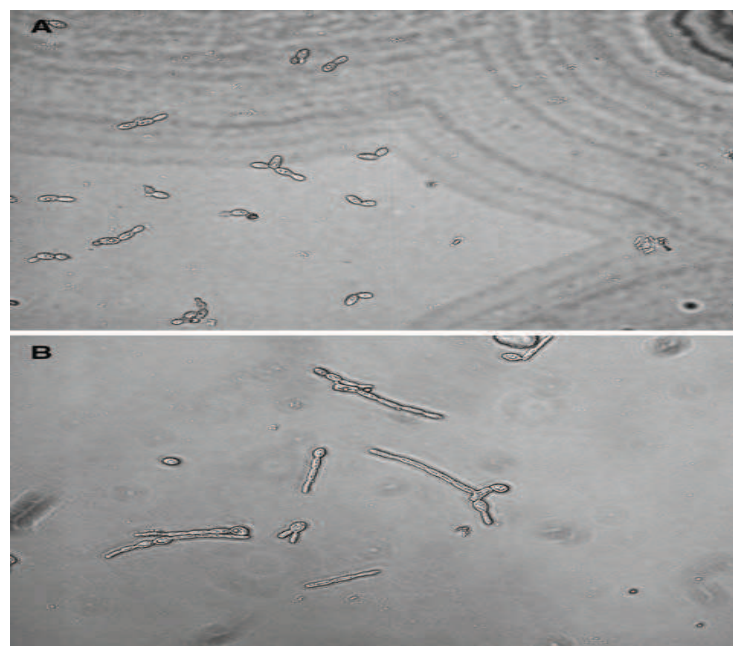




**Figure 7 :** evolution of the amount of microbial cells (a), the extracellular lipase activity (b) and the lip2 expression (c) in function of the reactor configuration



**Figure 8 :** specific rate for the extracellular lipase production by *Y. lipolytica* cultivated in different reactor configuration (see figure 1 for more details about these configurations)



**Figure 9 :** comparison of a culture conducted in a P-SDR with the classical pH regulation (a) where the normal yeast cell shape is observed and in a P-SDR conducted with the pH regulation performed at the level of the nonmixed part (b) where filamentation is observed

## Conclusion

In this work, the effect of the environmental factors on *Y. lipolytica* has been observed at two distinct physiological levels. At a first physiological level, corresponding to mild stressful conditions, the impact of the considered environmental factor is observed at the level of the biomass yield and the specific rate of lipase production. In case of severe stressful conditions, a second physiological level is involved and the impact of the environmental condition is observed directly at the level of the lipase gene expression (in our case the lip2 gene, encoding for the main lipase of *Y. lipolytica*). This second physiological level has been observed mainly for the experiments involving the dissolved oxygen fluctuations performed in a C-SDR. For the two others environmental factors, i.e. the methyl oleate dispersion efficiency and the pH gradient, only an impact on the biomass growth and on the specific rate of lipase production has been noted (except for the pH gradient experiment conducted in a P-SDR with a residence time of 2.5 minutes for which a slight effect on the lip2 gene expression has been observed). However, the impact of these two environmental factors have been studied in a partitioned scale-down reactor and are difficult to characterize in intensity, considering the special configuration of this reactor. Further studies will be conducted for a better characterization of the intensity and the frequency of the above mentioned environmental factors by the implementation of some hydrodynamic model. These experiments will be conducted in parallel with the numerical characterization of the local intensity of the environmental factors in industrial-scale bioreactors.

## References

- Delvigne F., D. J., Thonart P. 2006a. A methodology for the design of scale-down bioreactors by the use of mixing and circulation stochastic models. *Biochemical engineering journal*, 28(3): 256-268.
- Delvigne F., L. A., Destain J., Thonart P. 2006b. Stochastic models to study the impact of mixing on a fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology progress*, 22: 259-269.
- Destain, J., Fickers, P., Weekers, F., Moreau, B., & Thonart, P. 2005. Utilization of methyloleate in production of microbial lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121: 269-277.
- Destain J., F. P., Weekers F., Moreau B., Thonart P. 2005. Utilization of methyloleate in production of microbial lipase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 121-124: 269-278.
- Destain J., R. D., Thonart P. 1997. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology letters*, 19(2): 105-107.
- Enfors S.O., J. M., Rozkov A., Xu B., Hecker M., Jürgen B., Krüger E., Schweder T., Hamer G., O'Beirne D., Noisommit-Rizzi N., Reuss M., Boone L., Hewitt C., McFarlane C., Nienow A., Kovacs T., Trägårdh C., Fuchs L., Revstedt J., Friberg P.C., Hjertager B., Blomsten G., Skogman H., Hjort S., Hoeks F., Lin H.Y., Neubauer P., van der Lans R., Luyben K., Vrabel P., Manelius A. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of biotechnology*, 85: 175-185.
- Fickers P., B. P.-H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.-M. . 2005a. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications. *FEMS yeast research*, 5: 527–543.
- Fickers P., D. J., Thonart P. 2005b. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the *lipolytic* yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology letters*, 27: 1751-1754.
- Fickers P., N. J. M., Gaillardin C., Destain J., Thonart P. . 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of applied microbiology*, 96: 742–749.
- Guerzoni M.E., L. R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., Suzzi G. 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International journal of food microbiology*, 69: 79-89.
- Hewitt C.J., O. H., Lewis G., Taylor I.W., Nienow A.W. 2007. A Comparison of High Cell Density Fed-Batch Fermentations Involving Both Induced and Non-Induced Recombinant *Escherichia coli* Under Well-Mixed Small-Scale and Simulated Poorly Mixed Large-Scale Conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 96(3): 495-505.
- Lara A.R., G. E., Ramirez O.T., Palomares L.A. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors - Understanding the effects of environmental gradients on cells. *Molecular biotechnology*, 34: 355-381.
- Namdev P.K., Y. P. K., Thompson B.G., Gray M.R. 1991. Experimental simulation of large-scale bioreactor environments using a monte carlo method. *Canadian journal of chemical engineering*, 69: 513-519.
- Neubauer P., H. L., Enfors S.O. 1995. Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations. *Biotechnology and bioengineering*, 47: 139-146.
- Ruiz-Herrera J., S. R. 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives in microbiology*, 178: 477-483.

Szabo R., S. V. 2002. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. ***FEMS microbiology letters***, 206: 45-50.

## Chapitre III

---

# Impact des limitations en oxygène dissous sur l'activité *lip2*

**Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :**

Kar, T., Thonart, P., Destain, J., Delvigne, F. (2010). Impact of scaled-down on dissolved oxygen fluctuations at different levels of the lipase synthesis pathway of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 14(S2), 523-529.

# Impact des limitations en oxygène dissous sur l'activité *lip2*

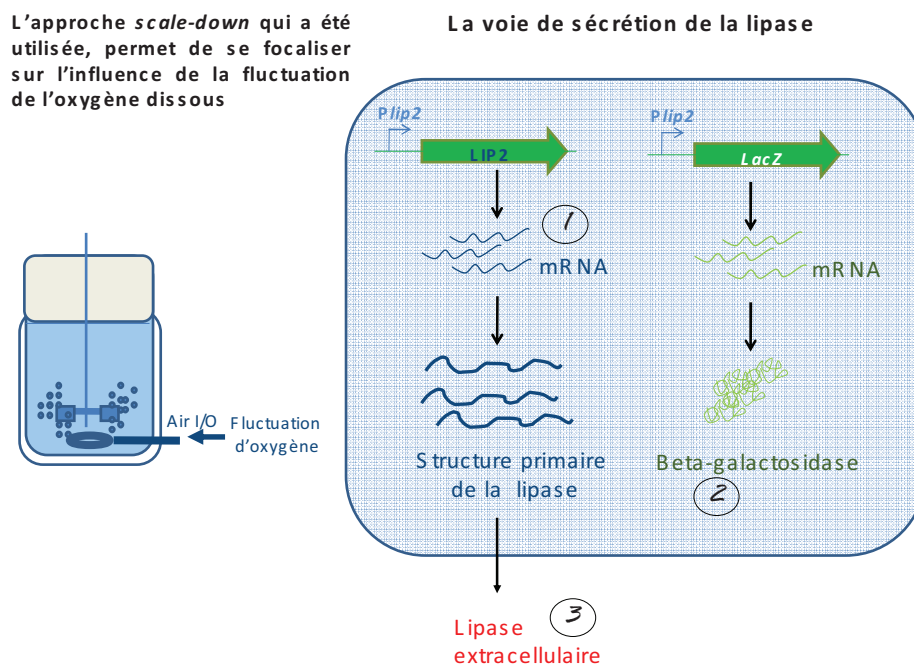
## Résumé

### *Objectif et stratégie expérimental :*

Il a été démontré précédemment que les fluctuations en oxygène dissous constituent le facteur limitant lors de l'extrapolation du procédé.

Cette partie du travail vise à caractériser plus précisément l'impact de la fluctuation de l'oxygène dissous sur la voie de sécrétion de la lipase. Pour ce faire, nous avons utilisé la RT-qPCR pour estimer le nombre de transcrits du gène *lip2* codant pour la lipase. Nous avons également estimé le taux de traduction des ARNm en protéine de manière indirecte (par un système rapporteur *LacZ*) et l'excrétion de la lipase dans le milieu de culture (par dosage de l'activité lipase dans le milieu de culture).

L'approche expérimentale développée est schématisée dans la figure suivante :



**Figure 1 :** illustration de l'approche expérimentale permettant de déterminer l'influence des fluctuations en oxygène dissous sur la voie de sécrétion de la lipase.

## Abstract:

The impact of the fluctuations in dissolved oxygen tension (DOT) on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* has been investigated in a *scale-down* reactor (SDR). This bioreactor comprises a 20 L agitated vessel with an automatic valve controlling the opening and closure of the air flow line. This kind of *scale-down* apparatus is used in order to generate DOT gradients encountered in large-scale, while maintaining the other environmental conditions constant. The impact of DOT fluctuations has been estimated at three levels of the lipase synthesis machinery: lipase gene expression, lipase translation, lipase excretion to the extracellular medium. Among these levels, the performance of lipase production under oscillating DOT was significantly affected at the lipase gene expression level.

Mots clés : Lipase, RT-qPCR, scale-down, stress microbien

Keywords: Lipase, RT-qPCR, scale-down, microbial stress

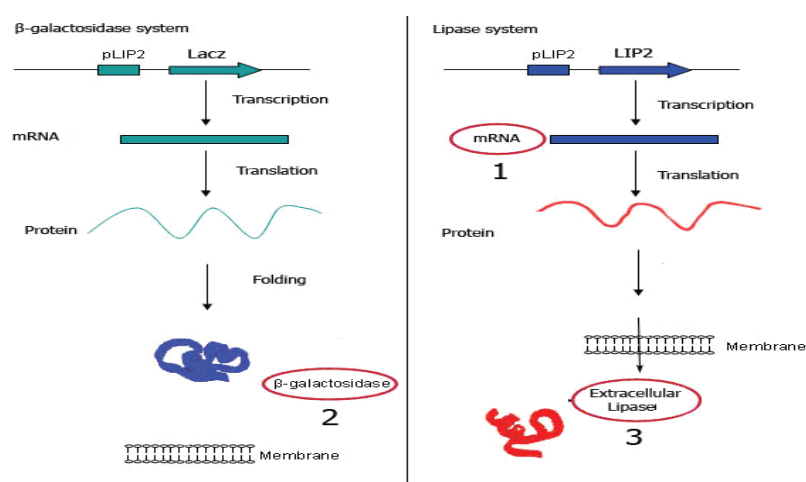
## Introduction

Microbial lipases have received increasing interest due to their wide variety of utilisation (Jaeger et al., 1994). The intensive production of lipase application requires the development of adequate large-scale cultivation methods. However, the optimal conditions of lipase production and the influence of extracellular factors (such as the carbon source level, pH, dissolved oxygen tension, nitrogen source etc...) are determined generally at laboratory scale for economic reason, and then the results are translated to the industrial scale. However, large-scale bioreactors exhibit lower mixing efficiency and the presence of spatial concentration gradients disturbing the microbial metabolism is an important problem that is frequently encountered in these bioreactors. It is possible to predict the potential problems at industrial scales by representing the existence of environmental gradients in specially designed *scale-down* reactors (SDR). The *scale-down* methodology has been first proposed by (Oosterhuis,

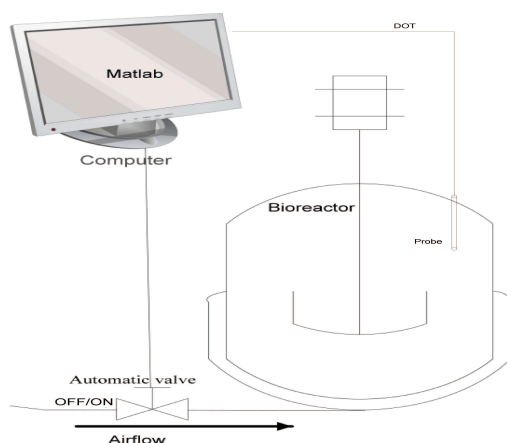


Kossen, Olivier, & Schenk, 1985) and consist to design lab-scale bioreactor in order to reproduce mixing imperfections experienced at the industrial level. The SDR is used to evaluate the effects of environmental gradients at the level of the culture performances. Such a methodology allows to identify the causes of existing problem, and to design a better scaling-up and operational strategies (Lara, Galindo, Ramírez, & Palomares, 2006). In a previous work, our group has demonstrated the effect of different extracellular factors on the lipase production by using different scale-down strategies. Those parameters were the carbon source accessibility (methyl oleate has been used as a carbon source and must be efficiently dispersed in the aqueous culture media), oscillating dissolved oxygen tension(DOT), and pH fluctuations (Kar, Delvigne, Masson, Destain, & Thonart, 2008). The effect of DOT fluctuations has been observed to be predominant by comparison with the methyl oleate dispersion efficiency and the pH gradient. The DOT level affects the lipase specific productivity owing to the fact that oxygen participates in the growth rate, primary metabolism of aerobic microorganisms, and as the substrate of various enzymes in various pathways for the production of secondary metabolites (John, Jonathan, & Charles, 1998; Lara et al., 2006; Serrato, Laura, Angélica, & Octavio, 2004). In order to get more informations about the mechanisms involved in the impact of DOT on lipase production, three steps of the lipase synthesis machinery. Firstly, the lipase gene translation (Lip2 gene code for the main lipase produced by *Y. lipolytica*) has been evaluated by using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction qRT-PCR. Secondly, the intracellular lipase synthesis has been investigated. For this purpose, the reporter strain *Yarrowia lipolytica* JMY775 (Lgx64.81 derivative transformed with LIP2–LacZ reporter gene (Fickers, Nicaud, Gaillardin, Destain, & Thonart, 2004)) was used, the amount of intracellular enzyme being measured the  $\beta$ -galactosidase activity. Finally, the extracellular lipase activity in the medium, linked with the lipase excretion rate, has been determined. The scheme shown at figure 1 highlights the

different physiological steps investigated in this work. Different DOT fluctuation profiles have been reproduced in a *scale-down* apparatus designed to simulate the heterogeneous conditions experienced in large scale bioreactors where cells are exposed sequentially to aerated and non-aerated zone. The SDR used is a 20-L stirred bioreactor equipped with an automatic air admission valve controlled by a specific algorithm (Namdev, Irwin, Thompson, & Gray, 1993) (Figure 2). Three DOT fluctuations profiles have been considered in order to highlight the effect of the duration and frequency of cell exposure to anaerobic conditions.



**Figure 1 :** Scheme of the lipase pathway synthesis have been investigated in this work. 1- The lipase gene expression was detected by qRT-PCR. 2- The translation process was detected by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity related to the lip2 promoter. 3- The lipase excretion was detected by measuring the extracellular lipase activity.



**Figure 2 :** Schematic diagram of the scale-down apparatus for simulating dissolved oxygen fluctuations encountered in large-scale bioreactors. Classical stirred bioreactor with an air admission valve sequentially opened and closed the air flow according to a specific cycling algorithm.

## Materials and methods

### Strain and culture conditions

*Yarrowia lipolytica* JMY775 is stored at -80 °C in working seeds vials (cells in suspension in glycerol solution 40%). The JMY775 strain has been obtained by genetic manipulation from a lipase overproducing strain (LgX64.81) modified with a LIP2-LacZ reporter gene. Cells are first precultivated in a 250-mL baffled shake flask containing 100 mL of YPG medium at 30 °C for 22 h. A second precultivation step is then carried out during 15 h in 2-L baffled shaken flasks containing 750 mL of medium containing glucose (15 g/L), tryptone N1 (10 g/L) (BHA, Belgium), yeast extract (10 g/L). After the precultivation steps, the culture is transferred to a 20-L bioreactor (Biolaffite-France; internal diameter 0.22 m) with a working volume of 13 L and equipped with two RDT6 rushton turbines ( $d = 0.1$  m). The cultivation media for the bioreactor has been optimized to be convenient for the lipase and RNAm extraction, it contains per liter: methyl oleate 30 mL (Cognis, France), tryptone N1 7.5 g and yeast extract 7.5 g. The regulation of the culture parameters (pH, temperature, etc.,) is ensured by a direct control system (ABB). The culture in the bioreactor is carried out at 30 °C with a fixed stirring speed of 350 rpm and an air flow rate of 0.75 vvm (volume of air per volume of medium per minute. In our case 0.75 vvm corresponds to 10 L/min).

The dissolved oxygen is continuously monitored with an oxygen probe (Mettler Toledo InPro 6800 series). DOT is reported as saturation percentage with a response time 2 seconds. The foam level in the reactor is monitored by an antifoam probe placed at 10 cm from top of the vessel. The foam level is then controlled by the addition of antifoam Tego KS911 (Goldschmidt, Germany). The pH of the broth is measured with a pH probe (Mettler Toledo InPro 2000/120/Pt100/9848) and is regulated at a value of  $7 \pm 0.1$  by the addition of KOH 6 N or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6 N.

## **Analytical methods**

### ***Cell Dry Weight Determination***

Biomass yield was determined after the elimination of the fatty fraction of culture medium. Fifteen millilitres of medium was centrifuged at 10000×g for 20 min (Avanti J-25I, Beckman, USA). The supernatant was eliminated, and the Harvested cells were washed twice with water and detergent 2%. Biomass concentration was measured by cell dry weight (CDW) which determine by filtration under vacuum of a 15-ml sample of the cellular suspension through hydrophobic polyethersulfone filters with pore 0.45u (Pall Life Sciences, USA). The filtered biomass was put in small aluminium dishes and dried at 105 °C for 24 h.

### ***Enzymatic Activity Assay***

The extracellular lipase activity is determined as follows: samples of the culture medium are withdrawn at various times of fermentation, centrifuged for 20 min at 10,000 g. The supernatant is then used for the extracellular lipase activity estimation using an olive oil emulsion as the enzyme substrate [olive oil 25%, 0.1 M NaOH 7.5%, polyvinyl alcohol (2%) 67.5%]. The enzymatic reaction is initiated by adding 1 mL of supernatant to 4 mL of emulsion with 5 mL of 0.1 M of phosphate buffer at pH 7. The enzymatic reaction is maintained for 15 min at 37 °C on a rotary shaker (150 rpm) and is subsequently stopped by the addition 20 mL of acetone–ethanol mix [1:1(v/v)]. The free fatty acids released during the reaction are then titrated with 0.05 M NaOH (Kar et al., 2008). One unit of lipase activity is defined as the amount of lipase inducing the release of 1 mmol of fatty acid per minute at 37 °C and pH 7. The translation level of lipase RNAm is performed on the basis of the parallel synthesis Beta-galactosidase by the LIP2–LacZ reporter gene JMY775 strain. The b-galactosidase activity, expressed in Miller unit/mg dry material, Miller unit is defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of o-nitrophenol (subsequent to the hydrolysis of the ortho-nitrophenyl-β-galactosidase ONPG) per minute and per 1 mg dry materiel at 37 °C.( we used the dry materiel instead of the optical density 600 nm to measure the b-galactosidase

activity to avoid the effect of the methyl oleate at the values of DO600) The b-galactosidase is extracted from the microbial cells by a chloroform permeabilization procedure as described previously (Fickers et al., 2004).

### **Extraction and purification of total RNA**

A culture sample of 15 mL was filtered under vacuum through 0.45 µm pore size filters. The filters were put in a falcon and conserved directly in the liquid azote to avoid the RNAm degradation. Then, the filters were conserved at -80°C. The E.Z.N.A.TM Yeast RNA Kit (OMEGA bio-tek®) was used to extract the RNA. DNase treatment was done to RNA samples using Turbo DNA-freeTM Kit

(Applied Biosystems) to remove the contaminating DNA from RNA preparation. RNA quality and quantification were analyzed using a GenesysTM Spectrophotometer. The cDNAs were subsequently synthesized using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems).

### **Real-time PCR conditions**

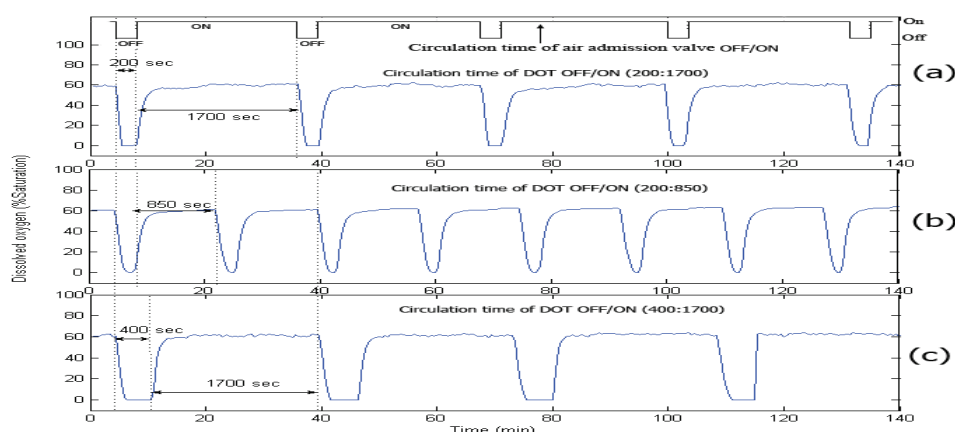
The primers for real-time PCR were designed to have a length of about 20-25 bases, a G/C content of over 50%, and a Tm of about 60°C. The length of the PCR products ranged between 90 and 150 bp. LightCyclerTM 163 software (Roche, Mannheim, Germany) was used to select primer sequences. The sequences of the primer encode the gene of Actin *ACT-R* (GGCCAGCCATATCGAGTCGCA), *ACT-F* (TCCAGGCCGTCCTCTCCC)(Mansour, Bailly, Delettre, & Bonnarne, 2009). The sequences of the primer encode the gene of Lip2 *LIP2-R* (ATCTGGTAGTCGGGATACTG), *LIP2-F* (TTGATCTTGCTGCTAACATC). All the primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). The SYBR green I PCR amplification was performed using a POWER SYBR® GREEN PCR (Applied Biosystems). The Amplification was carried out in a 25-µl (final volume) mixture containing 1000 ng of RNA sample, 0.3 µM of primer, and 12.5 µl of POWER SYBR® GREEN PCR (Applied

Biosystems). A negative control without cDNA added was systematically included. Real-time PCR is performed on instrument StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The experimental design is done by using the program StepOne™ Software v2.0.1 installed on a PC connected to the instrument; we used mode SYBR Green Reagents and Quantitation - Comparative CT ( $\Delta\Delta CT$ ). The same program was used to determine the threshold cycle (CT) values. The amplification procedure involved an incubation step at 95°C for 10 min for the initial denaturation, followed by 41 cycles consisting of: 1- denaturation at 95°C for 15-s, 2- for 1-min, 3- After real-time PCR, a melting curve analysis was performed by continuously measuring fluorescence during heating from 60 to 95°C at a transition rate of 0.3°C/s. Standard curves were generated by plotting the CT values as a function of the initial RNA concentration log. PCR efficiency (E) was then calculated using the following formula:  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ , where as four dilution of cDNA were prepared to determine the real time PCR efficiencies. The Actin gene (Blanchin-Roland, Da Costa, & Gaillardin, 2005) was chosen as a suitable internal control gene to normalize the results. The Pfaffl method (Pfaffl, 2001) was used to calculate the fold change in transcript abundance normalized to the Actin gene and relative to the sample collected at the beginning of fermentation in the fermentor (T0).

#### **Scale-down reactor strategies**

The SDR has been designed in order to consider that the ‘on and off’ state of the air admission valve corresponds to the cells displacement through respectively an aerated and a non-aerated fluid zone in a hypothetical industrial bioreactor. The effect of fluctuating DOT has been isolated by using this kind of SDR. It has been previously designed to specifically observe the impact of the DOT fluctuations on the microbial physiology (Namdev PK, Yegneswaran PK, Thompson BG, & MR, 1991). The SDR comprises a 20L stirred bioreactor and an air admission valve which controls the air injection (figure 1). The oscillating DOT is generated by sequentially opening and closing the air admission valve. Therefore, the air flow

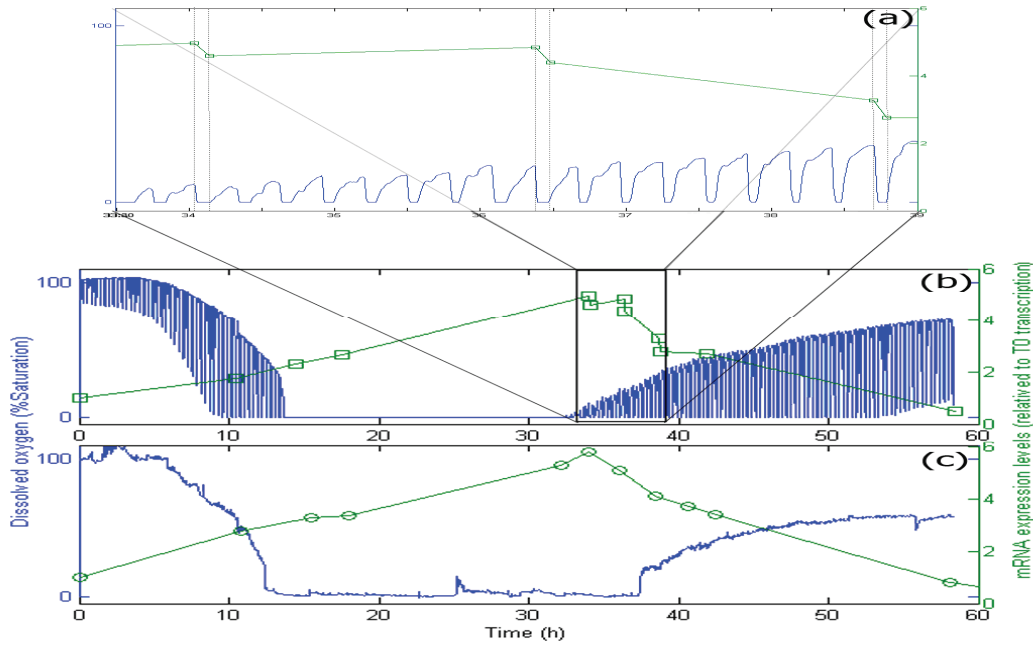
rate oscillations are characterized by the DOT profiles depicted at figure 3. The control algorithm imposes regular OFF/ON cycles to the air admission valve. Three OFF/ON cycles have been assessed to determine the effect of the length and frequency of cells exposure to non-aerated medium : a (200, 1700) profile for which air admission valve is closed for 200 seconds over a total cycling period of 1900 seconds. On the same basis, a (400, 1700) and a (200, 850) cycle have been considered.



**Figure 3 :** Comparison between the effects of the different DOT cycles on the dissolved oxygen profile

## Results and discussion

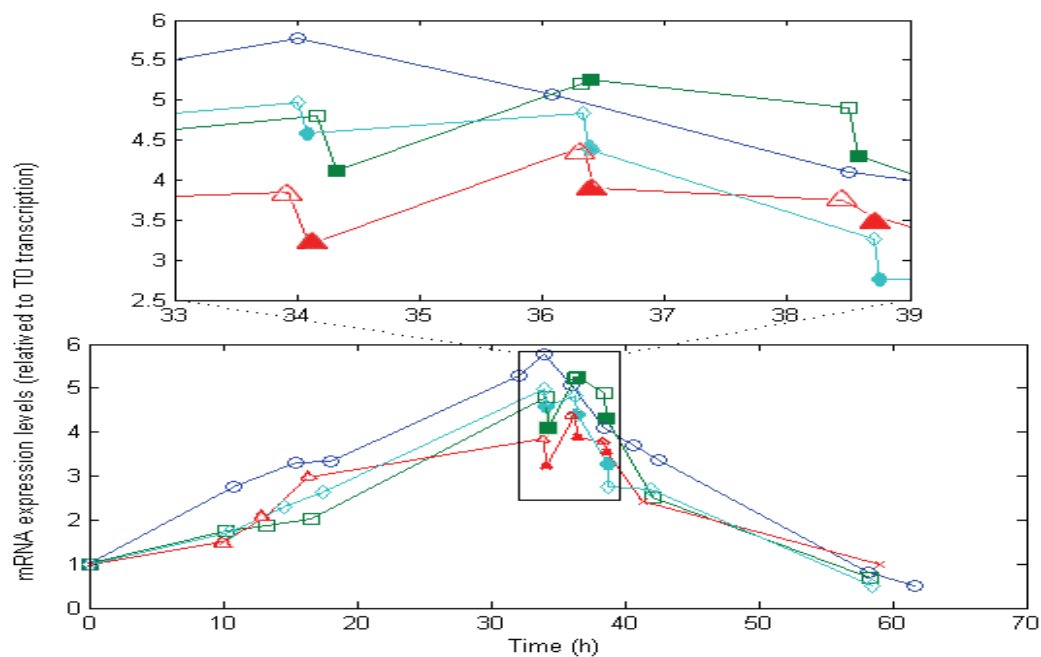
The experiments have been performed with the SDR system in order to investigate the effects of DOT fluctuations by comparison with a reference culture, i.e. a culture carried out in a bioreactor without considering any DOT fluctuations. Figure 4 shows a typical DOT evolution for a culture conducted under a constant air flow, compared with that obtained by considering a SDR operating with the (200,850) cycle. The effect of DOT oscillations on the amount of transcripts has been investigated by considering three different DOT cycling regimes. Among the techniques used to characterize the physiological response of *Y. lipolytica*, the RT-qPCR is the most powerful tool to amplify small amounts of mRNA and determine slight physiological response to fluctuating environmental conditions (Pfaffl, 2001).



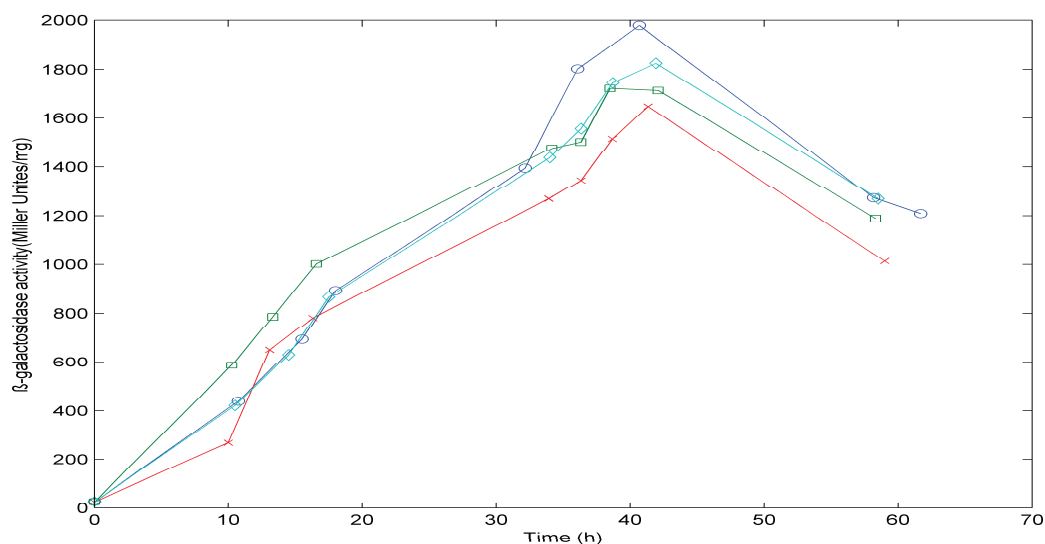
**Figure 4 :** Comparison of a DOT profile obtained in a SDR working under the (200, 850) cycle scheme (a and b) with that obtained in the case of a culture performed in a classical bioreactor without any DOT fluctuation (c). This last reactor is considered as a reference throughout this work

As seen from figure 5, the amount of lip2 mRNA for all oscillating DOT conditions decreases considerably for the samples taken during the non aerated period of the cycle (resulting from the closure of the air admission valve by the controller). Non aerated time intervals of 200 seconds was enough to observe a decrease at the level of the amount mRNA transcripts. This observation is in accordance with the time constant associated with mRNA degradation which is around 1 to 3 minutes. At another level, the protein translation rate has been monitored by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity related to the lip2 promoter (figure6). The results depicted at figure 6 show that the  $\beta$ -galactosidase activities recorded in the case of the SDR are slightly lower than those noticed for the reference reactor. It can be observed that the protein synthesis follows the mRNA dynamics. The  $\beta$ -galactosidase dynamics is slower considering the higher time constants linked with protein synthesis and turnover. The final step of lipase secretion has been determined by measuring the activity of the lipase in the extracellular medium.





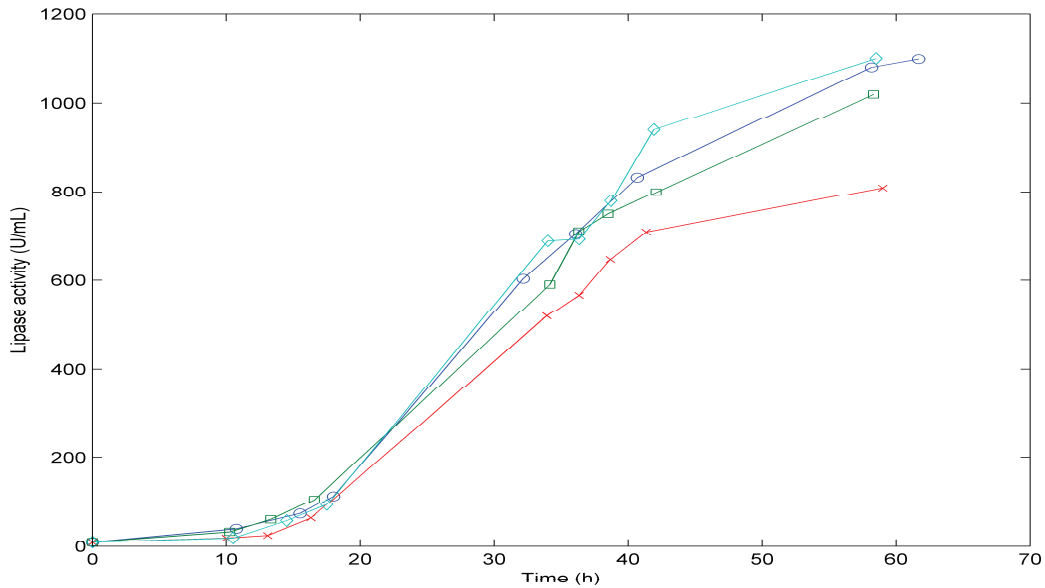
**Figure 5 :** Evolution of lipase gene expression (the number of the mARN copies of the sample devised at the number of the mARN copies in T0). Reference (O). Scale-down with a circulation time (200, 850) the taken sample at the end of turning on the air flow (◇) and at the end of turning off the air flow (◆). Scale-down (200, 1700) at the end of turning on the air flow (□), at the end of turning off the air flow 1700 (■). Scale-down (400, 1700) at the end of turning on the air flow (Δ), at the end of turning off the air flow 1700 (▲).



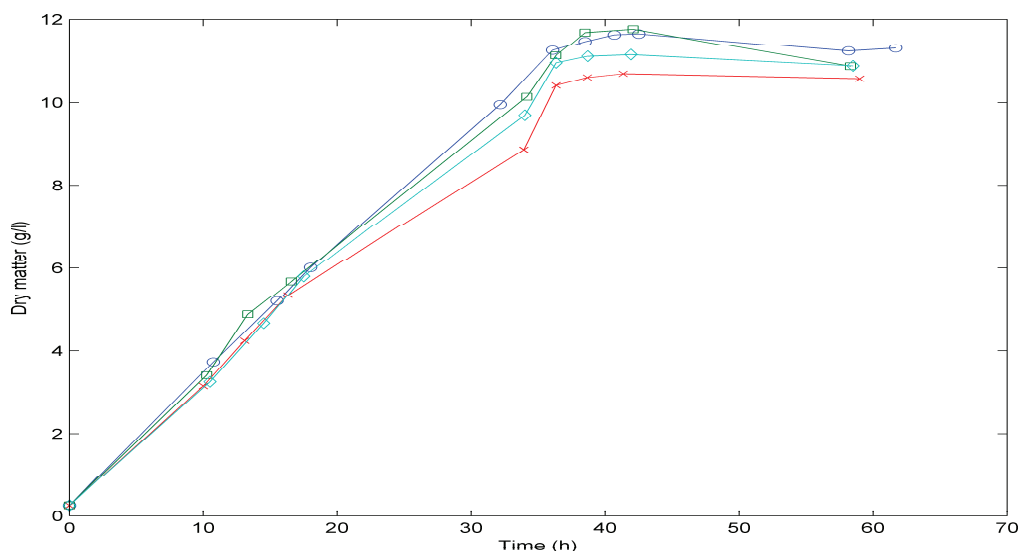
**Figure 6 :** Evolution of Beta-galactosidase activity of the reference and SDRs

Figure 7 shows a pronounced drop at level of extracellular lipase production in the case of the SDR conducted under the (400, 1700) cycling regime, but no differences have been

observed between the other SDR experiments and the reference. This result was expected according to the previous results obtained for the amount of mRNA and the  $\beta$ -galactosidase activities recorded for this reactor. As shown in figure 8, no differences can be observed between the cells growth curves obtained in SDR and in the reference bioreactor, except in the case of (400, 1700) cycling profile, for which the cells are exposed to the longer oxygen deprivation periods. The results obtained throughout this work can be globally explained by comparing the time constant associated with the DOT cycling regimes and those associated with the different physiological responses. Indeed, the time constant associated with the DOT fluctuations is around 3 minutes, whereas the time constant associated with mRNA dynamics is in the order of 0.5 to 2 minutes, and around 10 minutes and 60 minutes for protein dynamics and cell growth respectively. It is thus logical to observed the more pronounced differences at the level of the amount of lip2 mRNA.



**Figure 7 :** Evolution of lipase activity of the reference and the SDRs



**Figure 8 :** Evolution of the biomass dry matters for the reference and the SDRs

## Conclusion

In this work, a *scale-down* bioreactor has been used in order to simulate DOT fluctuations. The impact of DOT fluctuations on *Y.lipolytica* has been investigated at different levels of the lipase synthesis pathway. Three different oscillating aerobic/anaerobic profiles were performed in the *scale-down* system. It has been observed that the switch from aerobic to anaerobic conditions decrease the rate of the lipase gene expression (lip2 gene investigated by RT-PCR), even at transient exposure to anaerobic condition as short as 200 sec. This effect was more pronounced when the frequency of the exposure to anaerobic conditions was increased. At a second level, i.e. depicted by measuring the  $\beta$ -galactosidase translational rate linked with the lip2 promoter, for the constant and oscillating DOT cultures the protein translation is not altered by the fluctuation of DOT. Finally, the activity of the extracellular lipase was similar in constant DOT and the experiments carried out with 200 sec aeration off and different sequences (850sec, 1700sec), even if differences have been observed at the level of the amount of lip2 transcripts for the same operating conditions. The same reduction rate of the messenger RNA has been observed mainly for the experiment involving the (400, 1700)

DOT fluctuation profile, this profile representing the more severe condition for which cells are exposed to the longer oxygen deficiency period. In conclusion, no significant differences have been observed for the cell growth between the reference and the SDR bioreactors, apart from a slight decrease at the level of the lipase yield in the case of the SDR conducted with longer oxygen limiting period. The most sensitive parameter that has been linked with DOT fluctuations is the number of lip2 mRNA determined by RT-qPCR. This is not surprising since the half-life of mRNA synthesis and degradation is very low (about 10 to 100 seconds for synthesis and about 1 to 3 minutes for degradation) compared to the amplitude of the DOT fluctuations. Nevertheless, this technique is time consuming and cannot be used to perform at-line analysis of the process. A faster way to perform at-line or on-line analysis of a physiological parameter during a fermentation process is to consider the use of a reporter system, like the lacZ reporter gene considered in this work. The drawback associated with this technique is that it is based on protein accumulation inside the cell, a physiological process characterized by a time constant of a few minutes, which is higher than the time constant of most of the extracellular perturbations. Efforts must thus be done at the level of the reporter system in order to increase their sensitiveness to extracellular perturbations.

## Reference

- Blanchin-Roland, S., Da Costa, G., & Gaillardin, C. 2005. ESCRT-1 components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Microbiology-Sgm**, 151: 3627-3637.
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J., & Thonart, P. 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, 96(4): 742-749.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Vanheuver, M., & Misset, O. 1994. Bacterial Lipases. **Fems Microbiology Reviews**, 15(1): 29-63.
- John, O. K., Jonathan, K., & Charles, L. C. 1998. Effects of Oxygen on Recombinant Protein Expression. **Biotechnology Progress**, 14(3): 393-409.
- Kar, T., Delvigne, F., Masson, M., Destain, J., & Thonart, P. 2008. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35(9): 1053-1059.

- Lara, A., Galindo, E., Ramírez, O., & Palomares, L. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors. *Molecular Biotechnology*, 34(3): 355-381.
- Mansour, S., Bailly, J., Delettre, J., & Bonnarme, P. 2009. A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics*, 9(20): 4714-4725.
- Namdev PK, Yegneswaran PK, Thompson BG, & MR, G. 1991. Experimental simulation of large-scale bioreactor environments using a monte carlo method. *Can J Chem Eng* 69: 513–519.
- Namdev, P. K., Irwin, N., Thompson, B. G., & Gray, M. R. 1993. Effect of Oxygen Fluctuations on Recombinant *Escherichia-Coli* Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(6): 666-670.
- Oosterhuis, N. M. G., Kossen, N. W. F., Olivier, A. P. C., & Schenk, E. S. 1985. Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(5): 711-720.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.*, 29(9): e45-.
- Serrato, J. A., Laura, A. P., Angélica, M.-A., & Octavio, T. R. 2004. Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(2): 176-188.

## Chapitre IV

---

# Optimisation du transfert d'oxygène et de la régulation antimousse

**Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :**

Kar, T., Destain, J., Thonart, P., Delvigne, F. (2011) Physical and physiological impacts of different foam control strategies during a process involving hydrophobic substrate for the lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **in press**

# Optimisation du transfert d'oxygène et de la régulation antimousse

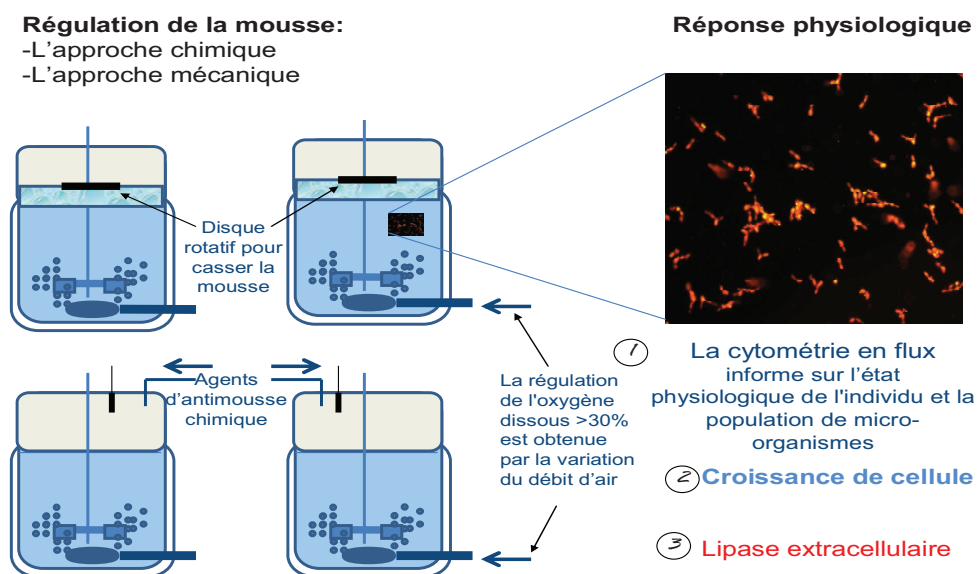
## Résumé

### *Objectif et stratégie expérimental :*

Généralement, la réduction du transfert d'oxygène est induite par l'ajout d'antimousse chimique. Cette partie visait à mettre en oeuvre une alternative pour contrôler la mousse basée sur une méthode mécanique de type *Stirring As Foam Disruption* (SAFD). L'étude de l'efficacité de l'approche mécanique a été basée sur les paramètres physiologiques abordés précédemment.

Du fait du caractère hétérogène du milieu (phase mousse et phase liquide observées simultanément en cours de procédé), la cytométrie en flux a été utilisée en complément afin d'obtenir des informations au niveau du comportement individuel des cellules au sein de la population.

L'approche scientifique est schématisée au niveau de la figure 1 :



**Figure 1 :** Contrôle de la mousse en utilisant deux approches, mécanique et chimique et la conséquence du système de contrôle sur trois paramètres physiologiques liés aux performances du procédé

## Abstract

The potentialities for the intensification of the process of lipase production by the yeast *Yarrowia lipolytica* on a renewable hydrophobic substrate (methylolate) have been investigated. The key factor governing the lipase yield is the intensification of the oxygen transfer rate, considering the fact that *Y. lipolytica* is a strict aerobe. However, considering the nature of the substrate and the capacity for protein excretion and biosurfactant production of *Y. lipolytica*, intensification of oxygen transfer rate is accompanied by an excessive formation of foam. Two different foam control strategies have thus been implemented: a classical chemical foam control strategy (CFM) and a mechanical foam control (MFM) based on the Stirring As Foam Disruption (SAFD) principle. The second strategy allows foam control without any modifications of the physico-chemical properties of the broth. However, the MFM system design induced the formation of a persistent foam layer in the bioreactor. This phenomenon has led to the segregation of microbial cells between the foam phase and the liquid phase in the case of the bioreactors operated with MFM control, and induced a reduction at the level of the lipase yield. More interestingly, flow cytometry experiments have shown that residence time of microbial cells in the foam phase tends to induce a dimorphic transition which could potentially explain the reduction of lipase excretion.

**Keywords :** foam control, scale-up, bioreactor, flow cytometry

## Introduction

Lipase is an important enzyme with a broad range of applications in the food and pharmaceutical industries, as well as a biocatalyst for the synthesis of biopolymers, agrochemicals, and flavour compounds (Jaeger et al., 1997). The broad range of applications of lipases and the relatively low value of this product have driven the development of



optimized large-scale production methods on renewable substrate (Beopoulos, 2009; Fickers P., 2006). Many authors have reported that dissolved oxygen level is a key performance parameter involved in the lipase production process (Chen, Wen, & Chen, 1999; Elibol & Ozer, 2000; Lee & Rhee, 1993; Lopes, 2008). In our previous work, dissolved oxygen availability has been reported as the main chemical engineering parameter influencing the physiological mechanisms involved during lipase synthesis (Kar, 2008; Kar, Destain, Thonart, & Delvigne, 2010). Indeed, oxygen limitation tends to decrease the activity of the *lip2* promoter, responsible for the production of the main extracellular lipase of *Y. lipolytica*. However, another issue associated with oxygen management in this kind of microbial process is the formation of foam. In our case, foaming of the broth can be induced by several factors, such as the synthesis of biosurfactant by *Y. lipolytica*, the lipase itself which is a protein exhibiting a high affinity for the gas-liquid interface and to a lesser extent to the use of a hydrophobic substrate exhibiting surface active properties. In our case, methyloleate has been used as a renewable substrate allowing the induction of a significant amount of lipase during the process (Destain, 2005; Fickers, 2005). Foam formation is a big challenge for process engineer, especially when intensive aeration is required. Adverse effects of foam are multiple (Delvigne, 2010; Ghildyal N.P., 1988; Junker, 2007), i.e. decrease of the working volume of the reactor, removal of microbial cells and metabolites, increased risk of contamination, decrease of the oxygen transfer rate after the addition of chemical antifoam. Additionally, the toxic effects of chemical antifoams on cell physiology, and their impact on microbial physiology are not well understood. Generally, most of the above-mentioned issues are related to the use of chemical antifoam agents whose addition induces strong modifications of the physico-chemical properties of the broth. In order to overcome these problems, a mechanical defoaming method can be used. However, this kind of method involves the use of an additional motor dedicated to foam disruption, leading to an increase of the equipment and

operating costs. In order to reduce these costs, several turbines have been designed in order to be effective when placed directly on the shaft of the bioreactor in a control strategy themed Stirring As Foam Disruption (SAFD) (Boon L.A., 2002; Hoeks, 2003). The SAFD principle involves a dedicated impeller located on the main agitation shaft in order to mechanically disrupt foam. By this way, operating costs are fairly similar to those needed to provide the energy required for mixing the culture broth. In this work, both chemical antifoam method (CFM) and mechanical defoaming method (MFM) based on the SAFD principle have been investigated. On the other hand, foaming issues in bioprocess operations are generally considered from the chemical engineering point of view. Because changes in environmental conditions due to uncontrolled chemical engineering variables (e.g., foam formation) can lead to significant modifications of the biological processes, the microbial stress response must be taken into account. In this work, the impact of foam formation on the physiological processes involved in lipase synthesis (e.g., gene expression and enzyme excretion) has been investigated and has been related to the chemical engineering performances of the system.

## **Materials and methods**

### **Strain and culture conditions**

*Yarrowia lipolytica* JMY775 was stored at -80 °C in working seeds vials (cells in suspension in glycerol solution 40% vol). The JMY775 strain was obtained by genetic manipulation from a lipase overproducing strain (LgX64.81) modified with a *lip2-lacZ* reporter gene. Cells have been first precultivated in a 250-mL baffled shake flask containing 100 mL of medium containing glucose 20 g/L, tryptone N1 10 g/L (BHA, Belgium), yeast extract 10 g/L (Organotechnie). After the precultivation step, the culture was transferred in a 2L lab-scale stirred bioreactor (Biostat B, Sartorius) with a working volume of 1.5 L and equipped with a rushton disk turbine with 6 blades RDT6 ( $d = 0.05$  m) operating at a stirring rate of 700 rounds per minute (rpm). The cultivation media contained per liter: methyl oleate

28 mL (Cognis, France), tryptone N1 7.5 g and yeast extract 7.5 g. During the experiments, pH was set to value of 7.0 by the addition of KOH 6 N or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6 N and the temperature has been maintained at 30 °C. Dissolved oxygen level was continuously monitored with an oxygen probe (Mettler Toledo InPro 6800 series). The foam was controlled by using either a mechanical breaker or chemical antifoam. When chemical antifoam was used, the foam level in the reactor was monitored by an antifoam probe placed at 5 cm from top of the vessel. The foam level was then controlled by the addition of a polyether-based antifoam Tego KS911 (Goldschmidt, Germany). When foam was detected, a dedicated regulation loop ensured the addition of pulses of 2.5 mL at an interval time between two pulses of 30 sec. When the mechanical method was used, the *foamdisc* system (d = 75 mm, Sartorius Stedim) was installed on the stirrer shaft as mechanical foam destroyer. The disk was located very close to the liquid surface in order to minimize the volume of foam generated during the process. The impact of the air flow rate on the process has also been estimated. In a first set of experiments involving both the CFM and MFM control, the air flow rate was fixed at 1 L/min. In a second time, the air flow rate was modulated on the basis of a DO-stat control with a set point of 30% (the maximum air flow rate being set at a value of 3 L/min). In this case, the DO-stat set point was successively modified to a value of 70, 50 and 30% in order to reach progressively the steady-state between the oxygen transfer rate and the oxygen consumption by the microorganisms. All the cultivation experiments were carried out in duplicate.

### **Oxygen transfer rate ( $K_La$ ) measurement**

The volumetric oxygen transfer coefficient  $K_La$  was determined by the dynamic gassing out method (Garcia-Ochoa, 2009). This method involved the stripping of the dissolved oxygen content out of the bioreactor by using nitrogen. In a second step, the medium was reoxygenated and the resulting dissolved oxygen concentration curve was recorded by a polarographic dissolved oxygen probe (Mettler Toledo InPro 6000). Recorded data were then processed and

regression analysis was performed in order to obtain the  $K_La$  value on the basis of the following equation:

$$\ln(C_L^0 - C_L) = -K_La \cdot t$$

With  $C_L^0$  (mg/L) being the dissolved oxygen concentration at saturation (mg/L) and  $C_L$  (mg/L) the dissolved oxygen concentration recorded by the probe at time  $t$  (s). The results were corrected in order to take into account the lag time of the dissolved oxygen probe. An experimental lag time value of 30s was determined in our conditions by alternating the immersion of the probe in an oxygen saturated solution and in a sodium sulphite solution.

#### **Cell Dry Weight Determination**

Biomass yield was determined after the elimination of the fatty fraction present in the cultivation medium. Fifteen millilitres of medium were centrifuged at  $10000 \times g$  for 20 min (Avanti J-25I, Beckman, USA). The supernatant was eliminated, and cells were harvested and washed twice with water and detergent 2%. Biomass concentration was estimated on the basis of the cell dry weight (CDW) after drying at  $105^\circ\text{C}$  until constant weight. Cells coming from a culture sample of 15 mL were recovered by vacuum filtration on hydrophobic polyethersulfone filters ( $0.45 \mu\text{m}$ , Pall Life Sciences, USA). The filters were then directly placed in aluminium dishes and dried at  $105^\circ\text{C}$  for 24 h.

#### **Determination of the *lip2:lacZ* reporter gene activity by flow cytometry**

Three milliliters of cultivation broth ( $\text{OD}_{600} = 10$ ) were centrifuged and the precipitate was washed three times by using phosphate buffered saline (composition : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and pH 7.4). The sample was then stored in 50% glycerol at  $-80^\circ\text{C}$  for the measurement of the beta-galactosidase activity. The intracellular beta-galactosidase synthesized on the basis of the activity of the *lip2* promoter was determined by flow cytometry. Cells were centrifuged and suspended in 1 mL of 70% cold ethanol and incubated on ice for 5 min. After centrifugation the cells were resuspended in 100

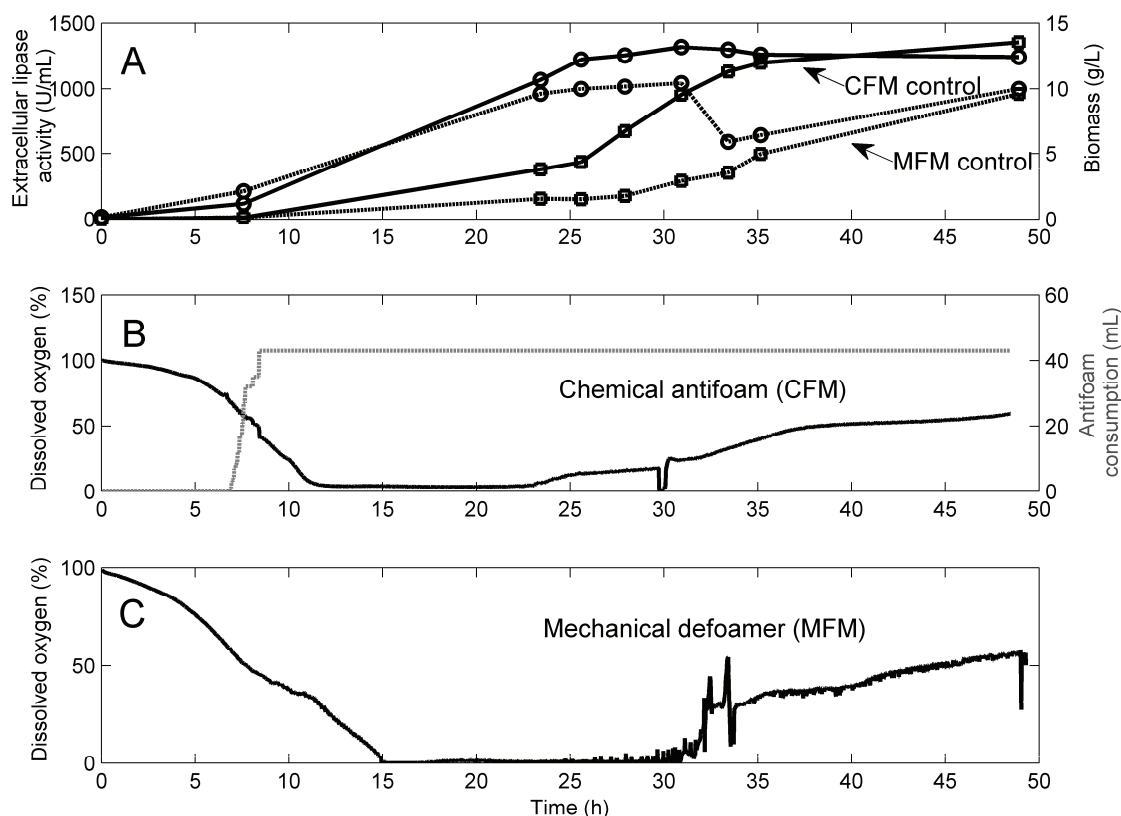
mL of TPM buffer (10 mM Tris/1 mM potassium phosphate/8 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.6). The FDG substrate (fluorescein di-f-galactopyranoside, purchased from invitrogen) was loaded into microbial cells by a successive hypertonic/hypotonic treatment. For loading, 50 µL of cells in TPM were mixed with 50 µL of 0.4 M NaCl, vortexed for 10 s, and then placed at 4°C for 2 min. A quantity of 10µL of the resulting solution was then diluted by adding 90 µL of a solution of 0.2 mM FDG and 25 µM phenylethyl P-D-thiogalactopyranoside (PETG, purchased from invitrogen) at 37°C for 1min. FDG loading was stopped after one minute by adding 1 ml cold PBS in order to avoid the leakage of the fluorescent product from the cells. A quantity of 10 µL of PETG 25 mM was added to stop the action of beta-galactosidase. The cells were then kept in ice until flow cytometry analysis. Flow cytometry analyses were performed by using a FACscan (Becton Dickinson) flow cytometer. For each measurement, 30,000 cells were analysed. Fluorescent molecules resulting from the cleavage of FDG were excited at 488 nm and emission signals were collected by using filters at 514 nm (FL1 channel of the flow cytometer). The FSC, SSC, FL1, FL2 and FL3 channels were logarithmically amplified with the following settings: FSC E0-1, SSC 360, FL1 500, FL2 300, FL3 300. The results were analysed by using the Flowjo 6.1 software. Experiments were performed in triplicate on two independent samples and representative results have been shown in a FSC/FL1 diagram.

## Results and discussion

### **Comparison between mechanical and chemical antifoam methods : bioreactors operated under constant air flow rate**

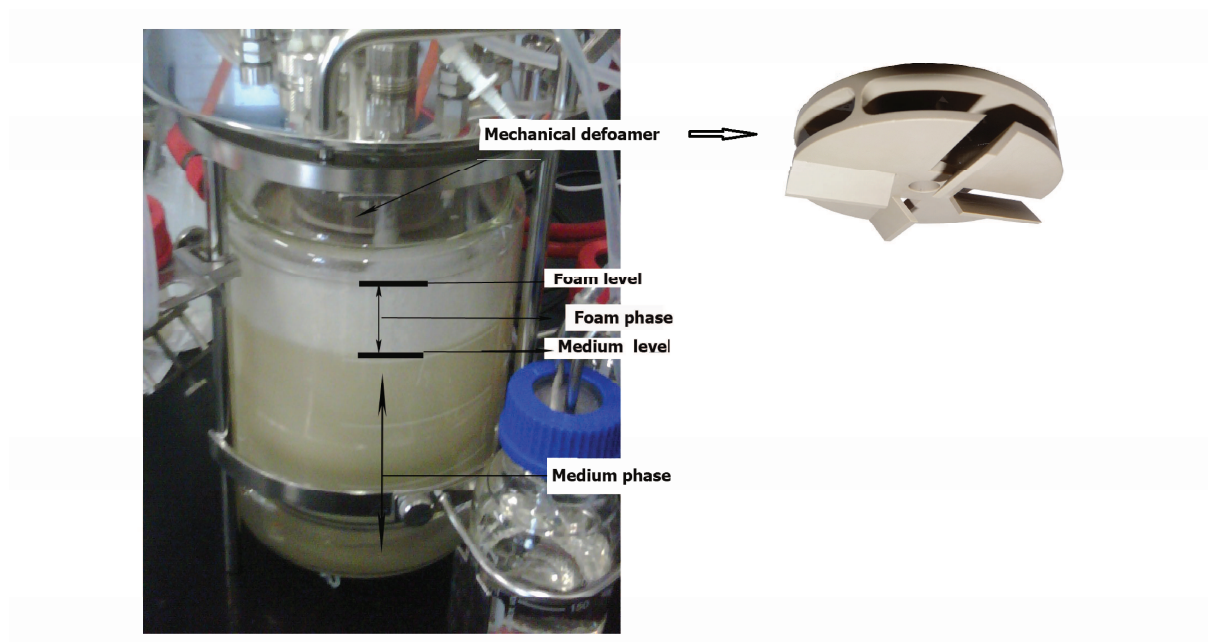
Both chemical and mechanical foam control strategies have been investigated in order to evaluate their impact at the level of the lipase production by *Y.lipolytica*. The first set of experiments has been performed by considering a constant air flow rate during the culture. Direct comparison of the CFM and MFM methods under the same operating conditions shows

a reduction of the extracellular lipase activity in the case of the bioreactor operated with mechanical foam disruption (Figure 1).



**Figure 1 :** Comparison of the performance parameters for the lipase production by *Y. lipolytica* with two different foam control strategies. A: evolution of biomass (circle) and extracellular enzyme activity (square) for the two cases B: Dissolved oxygen profile and antifoam consumption for the bioreactor operated under CFM (data representative of two independent experiments). C: Dissolved oxygen profile for the bioreactor operated under MFM (data representative of two independent experiments)

In order to understand the effect of the MFM control on lipase yield, a thorough observation of the experiments is required. Initially, the mechanical defoaming method (MFM) has been chosen in order to avoid the effect of antifoam agent on the physico-chemical properties of the broth. However, the problem associated with this method based on the SAFD principle is that a persistent foam phase is observed, in spite of the fact that the *foamdisk* system is located close to the surface of the liquid phase. Foam formation takes place in a zone located between the broth and the upper surface of the disk (Figure 2).



**Figure 2** : Picture showing the bioreactor operating under MFM control. The space between the liquid surface and the impeller used as SAFD system is completely filled with foam during the process

By comparison with the test carried out under the CFM control strategy, a lag time has been observed at the level of the dynamics of the bioprocess carried out with MFM (as observed at the level of cell growth and dissolved oxygen profiles at figure 1). After 33h, foam formation becomes uncontrollable by using the MFM system (associated with DO rise as shown in figure 1C), and the addition of 3 mL chemical antifoam has been necessary. The most important impact of the MFM control system is a significant decrease of the cell growth (Figure 1A). More precisely, a decrease of biomass concentration has been observed after 32 h and can be related to the removal of microbial cells from the medium and their accumulation in the foam phase. As stated above, it is generally recognized that physical defoaming methods are more suited because they do not modify the physico-chemical properties of the broth (Koch V., 1995). This is not entirely true in case of intensive foaming because the distance between the liquid surface and the *foamdisk* leads to the formation of a



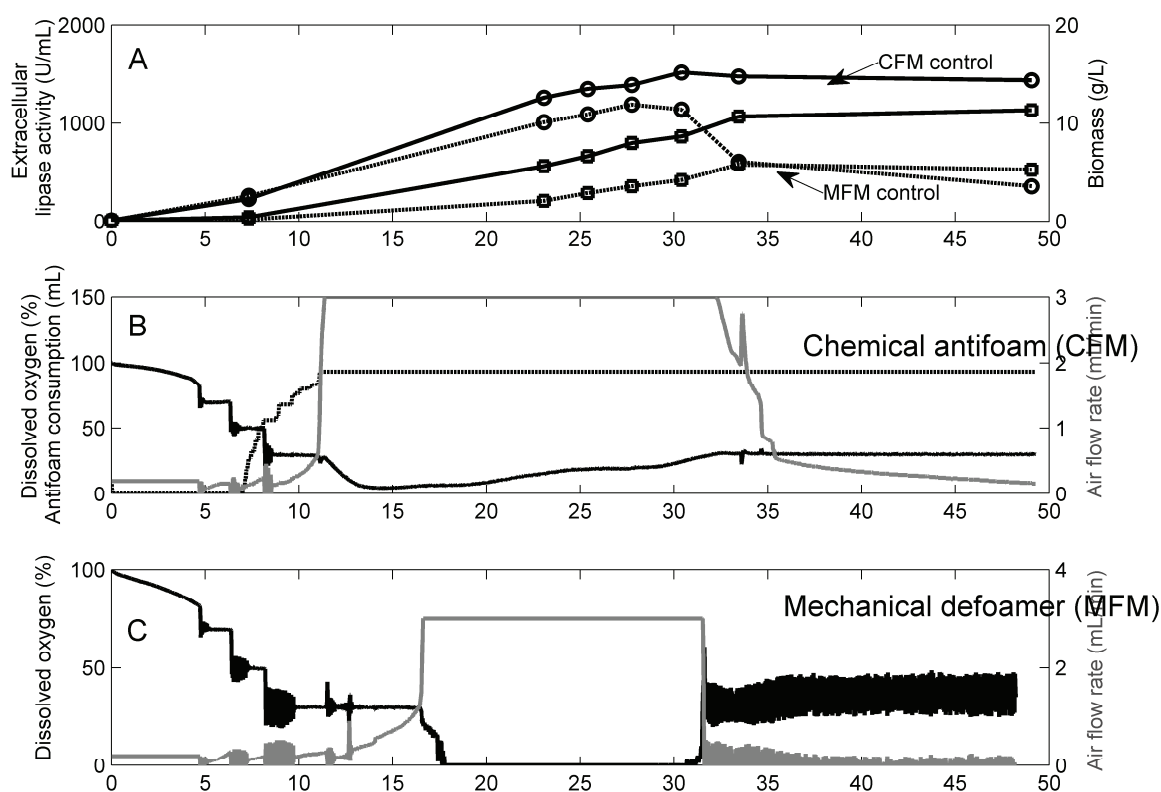
persistent layer of foam (Figure 2). Microbial cells are then exposed to environmental fluctuations when crossing this foam layer. This effect would be attenuated with scale-up because surface related phenomena tends to decrease comparatively to those depending on the volume and the effect of the distance between the *foamdisk* and the liquid surface would be reduced. The second experiment has been performed by using the CFM. As shown in figure 1B, the addition of antifoam agent begins after 7 hours of culture and antifoam consumption is effective for two hours according to the signal of the antifoam probe, leading to a total quantity of 43 mL consumed at the end of the process. This phenomenon can be related to cell growth and the induction of lipase excretion by cells. In addition, *Y. lipolytica* produces emulsifying agents which reduce the interfacial tension. This reduction alleviates the limitation of interfacial surface area and increase the accessibility to the oil droplets finely dispersed in the medium. Many authors have reported that the presence of hydrophobic substrate induces biosurfactant synthesis by *Y. lipolytica* (Amaral, Colo, Coelho, Fontes, & Nele, 2009; Smita & Aditi, 2002). The addition of antifoam agent causes a reduction of the oxygen transfer efficiency. The  $K_{La}$  in the bioreactor has been measured in the broth without cells and a value of  $0.0213 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$  has been found. On the opposite,  $K_{La}$  decreases to a value of  $0.0169 \pm 0.0004 \text{ s}^{-1}$  when 43 mL of antifoam agent is added to the broth (this quantity is equivalent to the one added during a cultivation run). This reduction of the global mass transfer efficiency is well described in the literature and can be related to greater bubble coalescence in the bulk liquid or adsorption of antifoam to the interfaces of bubbles and cells (Aldric, 2009; Delvigne, 2010). The following section involves the use of a DO-stat strategy in order to optimize the air flow rate and the foam formation intensity.

#### **Comparison between mechanical and chemical antifoam methods : regulation of the dissolved oxygen level by modulating the air flow rate**

As stated before, oxygen transfer is the most critical parameter for the process investigated in this study. The possibility of the regulation of the DO level during the course of the culture

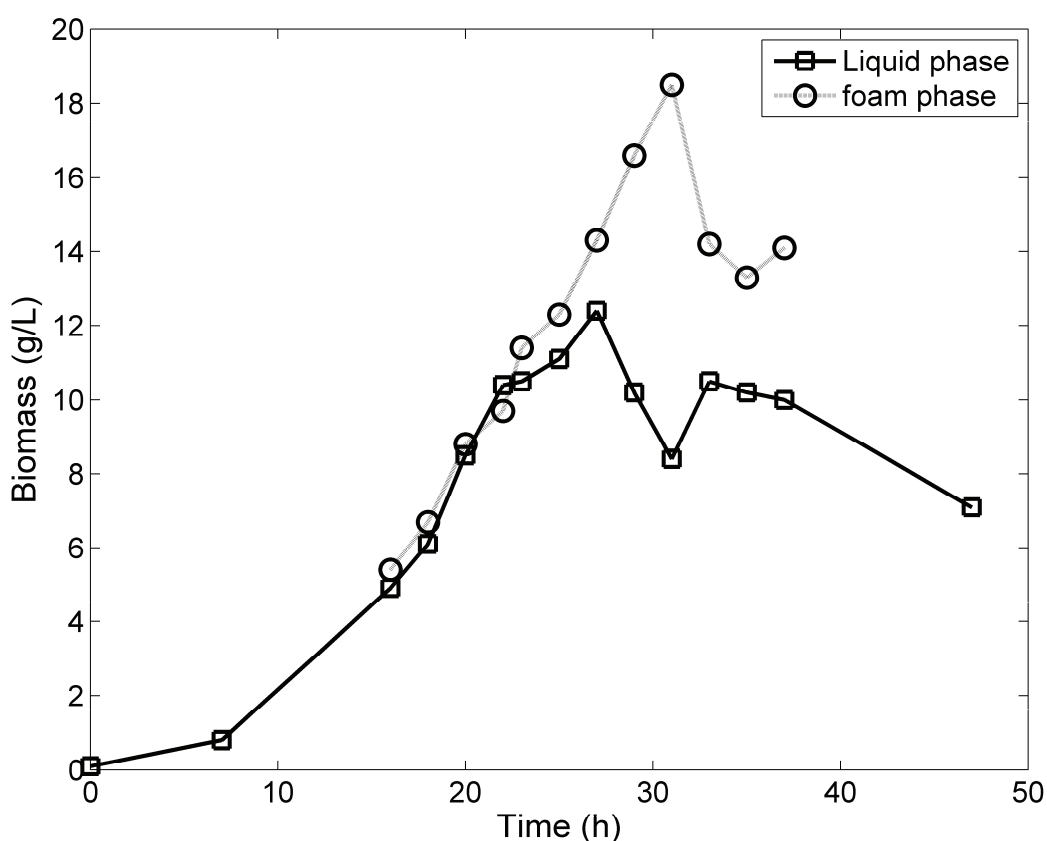


has been investigated by using the air flow rate as an actuator in a DO-stat regulation loop. By this way, DO level can be controlled at 30% of saturation during the culture (maximum admissible air flow rate has been fixed at 3 L/min). Bioreactor experiments involving DO-stat control in combination with the CFM and MFM foam control strategies have been performed. During these experiments, the dynamics of dissolved oxygen concentration, lipase activity, chemical antifoam injection (for CFM), air flow rate and cell growth have been investigated (Figure 3).



**Figure 3 :** Comparison of the performance parameters for the lipase production by *Y. lipolytica* with two different foam control strategies. A: evolution of biomass (circle) and extracellular enzyme activity (square) for the two cases B: Dissolved oxygen profile and antifoam consumption for the bioreactor operated under CFM (data representative of two independent experiments). C: Dissolved oxygen profile for the bioreactor operated under MFM (data representative of two independent experiments). For the two cases, the DO level has been controlled by a DO-stat regulation loop (30%) with the air flow rate as an actuator

Dissolved oxygen limitation has been observed in the case of the culture performed under MFM, whereas dissolved oxygen concentration has been maintained above 5% of saturation during the whole experiment by using CFM. In the case of the culture operated under MFM an oscillating mechanism at the level of the DO evolution has also been observed after 32 h in relation with the regulation by the air flow rate. The explanation of this phenomenon can be found when considering that a persistent foam layer is formed during the culture as observed for the previously (Figure 2). This phenomenon has been validated by biomass sampling at the level of the foam phase and the liquid phase during the bioreactor experiment operated under MFM (Figure 4).

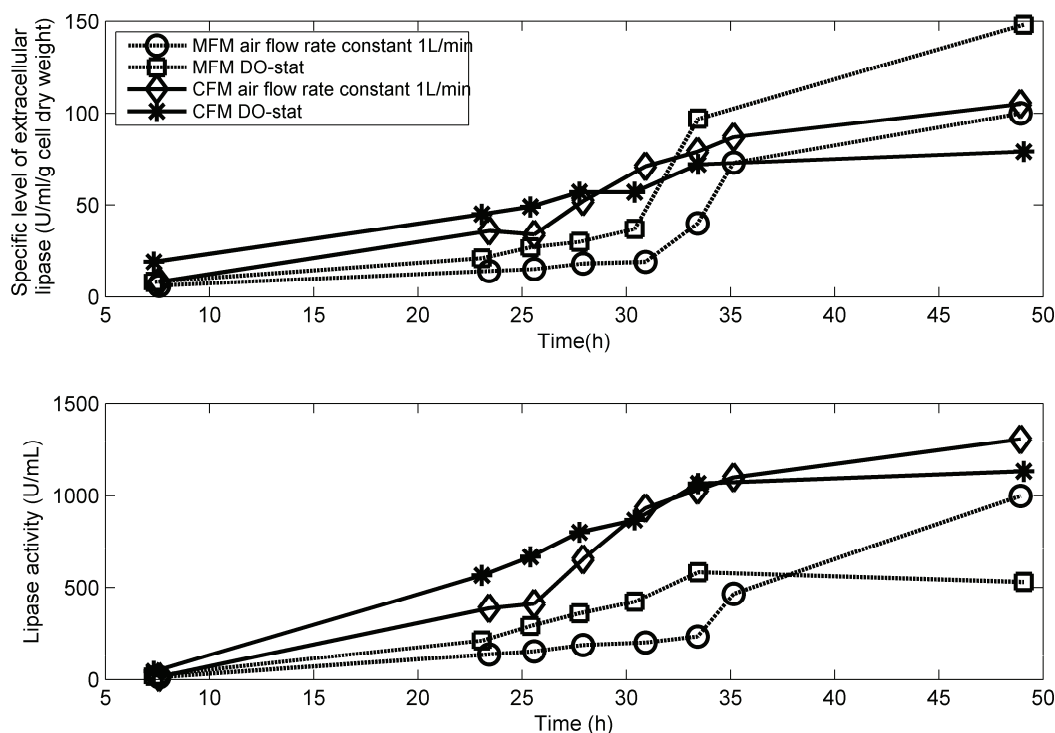


**Figure 4 :** Evolution of biomass concentration between the foam and the liquid phases of the bioreactor operated under MFM and under DO-stat regulation

Indeed, the accumulation of microbial cells in the foam phase has been observed after 28 hours of culture and is predominant after 31 h with 8 g/L of biomass in the liquid phase and 18 g/L in the foam phase. After 32 h, most of the cells are entrapped in the foam layer (Parthasarathy, 1988) inducing a decrease of the dissolved oxygen consumption in the liquid phase. Following the decrease of the oxygen demand, the DO level rises above 30% and the DO-stat regulation loop reacts by decreasing the air flow rate (Figure 3). The reduction of the air flow rate induces the collapse of the foam layer with the reincorporation of the microbial cells in the liquid phase. When most of the microbial cells are recovered in the liquid phase, the oxygen consumption increases, the DO level drops and the regulation loop induces the progressive increase of the air flow rate in order to cope with this DO requirement. The increase of the air flow rate induces the reformation of the foam layer with the progressive accumulation of microbial cells. This phenomenon is then repeated until complete depletion of the carbon source, i.e. in our case methyloleate. As a result, biomass concentration and extracellular lipase activity in the liquid phase is significantly lower than in the case of the culture performed under CFM. In the case of the culture performed under the CFM strategy, the antifoam agent consumption was of 94 ml, which is slightly higher than in the case of the culture performed previously in the same conditions but at constant air flow rate. In this case, foam has been tightly controlled during the whole culture and the antifoam agent injection has been effective only until 11.5 hours of culture as a result of the stabilization of the air flow rate.

#### **Impact of foam control strategies on the specific rate of lipase production**

The first set of observations involves the specific lipase production for the four kinds of bioreactor regimes investigated in this work (Figure 5A).



**Figure 5 :** Evolution of the specific lipase activity in function of the foam control strategy

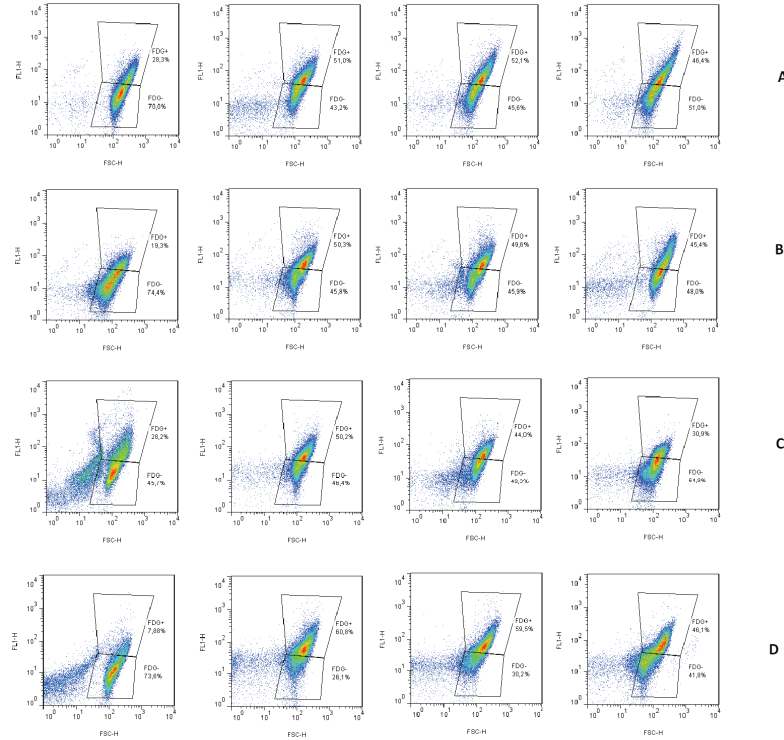
The lowest specific lipase level has been observed in the case of the cultures operated under MFM. This observation can be attributed to the persistent foam layer noticed during the cultivation tests as a result of the mechanical defoamer configuration. However, after 32 h, the specific lipase yield increases significantly for the two MFM-operated cultures, this yield becoming higher than that encountered in the CFM-operated cultivation tests. This cultivation time corresponds to the decrease of the stability of the foam layer with the reincorporation of microbial cells and lipase in the liquid phase, which explains the abrupt increase of these two species after 32 hours of cultivation in MFM-operated bioreactors. These values are thus an artefact linked to the incorporation of microbial cells in the foam phase, leading to an underestimation of the real biomass concentration in the liquid phase. Accordingly, the absolute extracellular lipase levels are significantly higher in the case of the cultures operated

under chemical antifoam regulation (Figure 5B), suggesting that SAFD-based mechanical defoamer strategy is not adapted to our process. Of course, this conclusion does not mean that conventional chemical defoamer comprising a dedicated motor/shaft assembly separated from the bioreactor mixing system could not be efficient in the context of this process. However, conventional mechanical defoamer present the drawbacks associated with additional operational costs that has to be attributed to the use of a second motor and mechanical system (Delvigne, 2010). Even if some correlation involving onset of foaming can be found in the literature (Pilon L., 2004), it is not easy to predict foaming issues during a microbial culture since physico-chemical properties of the broth continuously change and the induction of the synthesis of foaming agent by microbial cells is related to these complex modifications (Prins A., 1987; Van't Riet K., 1992). It seems thus that the picture is by far more complex than that depicted by reasoning only at the level of the physico-chemical parameters. Indeed, the impact of foam formation on microbial physiology must be considered in order to obtain the full explanation of the phenomenon observed during the tests. Microbial physiology has been thus be investigated by flow cytometry in the next section.

### **Investigation of the *lip2* gene expression at the single cell level**

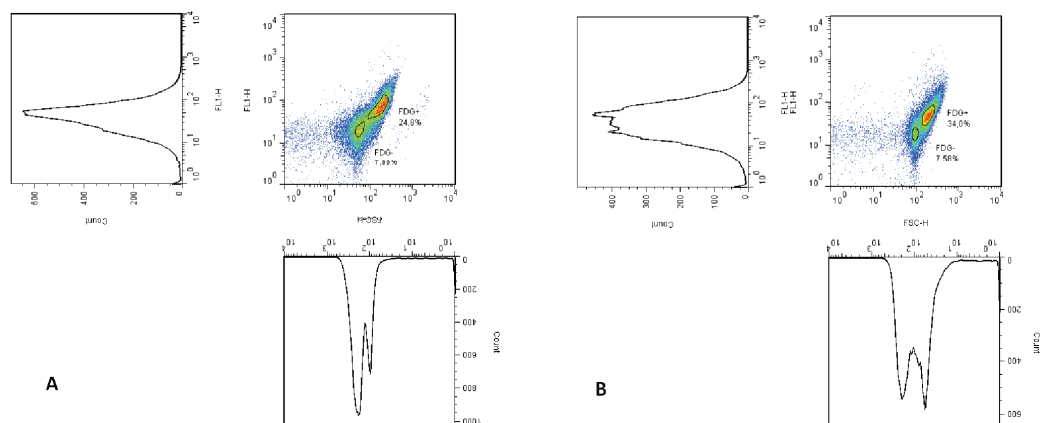
The segregation of microbial cells between the liquid phase and a persistent foam layer has been evoked during this work. This kind of segregation has been observed in the case of the cultures operated under a MFM control for which the design of the mechanical defoamer (i.e., the *foamdisk* system derived from the SAFD strategy) imposes the presence of a persistent foam layer during the process. The environmental conditions experienced in the foam phase are very different from those experienced in the liquid phase and could affect the lipolytic activity of *Y. lipolytica* (Guerzoni M.E., 2001). Our previous study has shown that strong environmental fluctuations in dissolved oxygen lead to a reduction of the expression of the *lip2* gene responsible for the synthesis of the main lipase of *Y. lipolytica* (Kar, 2008).

Accordingly, a set of flow cytometry experiments have been performed on cell samples coming from the different bioreactor operating conditions (Figure 6).



**Figure 6 :** flow cytometry profiles showing the cell size (x coordinate or FSC) in function of the FDG related green fluorescence (y coordinate or FL1). A: bioreactor operated under CFM at constant air flow rate. B: bioreactor operated under MFM at constant air flow rate. C : bioreactor operated under CFM at varying air flow rate. D: bioreactor operated under MFM at varying air flow rate. For each case, flow cytometry diagram is shown for 7h, 22h, 32h and 48h of culture (from left to right)

For each FSC/FL1 diagram, a FDG- and a FDG+ population has been depicted. The FDG- population corresponds to the states of the microbial cells at the beginning of the cultivation experiment, when the *lip2* system is not induced. Segregation into sub-populations has been noticed at the level of the samples taken from the bioreactor operated under the MFM mode. However, this segregation cannot be attributed to the FDG intensity but is rather attributed to the FSC signal corresponding to cell size (Figure 7).



**Figure 7 :** flow cytometry diagram showing the cell size (x coordinate or FSC) in function of the FDG related green fluorescence (y coordinate or FL1) for A: culture operated with MFM under varying air flow rate and B: culture operated with MFM under varying air flow rate. Histograms corresponding to the FSC and FL1 channels are shown in order to point out the heterogeneity of the population

The residence of microbial cells in the foam phase can be implicated in the dimorphism induction. Dimorphic transition is a well-known phenomenon for *Y. lipolytica*, but the exact causes of induction remains not fully understood (Ruiz-Herrera, 2002; Zinjarde, 1998). The most probable cause for dimorphic transition in *Y. lipolytica* has been attributed to pH change (Szabo R., 2002), and this fact has been validated in our previous work (Kar, 2008). The environmental conditions met by cells in the foam phase have not been characterized in the present study, but it seems that dimorphic transition could explain the segregation reported at the level of the flow cytograms in the case of the MFM-operated cultures. The impact of dimorphism on lipase synthesis is not well understood at this time, but it seems that this physiological change induces a drop at the level of the lipase yield (Guerzoni M.E., 2001;

Ruiz-Herrera, 2002; Szabo R., 2002; Zinjarde, 1998). Further studies are thus needed in order to address this phenomena.

## Conclusion

MFM strategy is not adapted to the process of lipase production by *Y. lipolytica*. Indeed, the *foamdisk* design, based on the SAFD principle, induces the formation of a persistent foam layer. Microbial cells tend to accumulate in the foam layer, leading to a reduction of the lipase yield for the cultures operated under the MFM regime. More interestingly, sojourn of microbial cells into the foam phase seems to induce a dimorphic transition, as shown by the segregation at the level of the FSC histogram recorded by flow cytometry. In our previous work, it has been observed that dimorphic transition tends to decrease the lipase yield (Kar, 2008). On the other hand, bioreactors operated under the CFM regime exhibit a level of extracellular lipase of about 1500 activity units/mL, corresponding to the maximum yield encountered when using methyloleate as a carbon source (Destain, 2005; Fickers, 2005). Considering these physiological impacts, chemical antifoam seems thus to be the best alternative in a scaling-up perspective. This statement must be nuanced by considering the economic constraints associated with the use of chemical antifoam and the costs associated to the use of a second motor/shaft system. Beyond these classical chemical engineering constraints, this work has clearly shown that the intensification of bioprocesses is strongly dependent on the physiological response of the microorganisms cultivated. In our case this response is linked with the residence time of cells into the foam phase. Recent works have shown that the intensification and scaling-up of bioprocesses are governed by the spatial heterogeneities experienced by the microbial cells in bioreactors (Enfors, 2001; Hewitt, 2007; Neubauer, 2010). During their residence inside the foam phase, microbial cells are exposed to various environmental heterogeneities and new tools to predict the impact of foam on microbial physiology are needed. Such tools can be derived from the scale-down principle.



This scale-down principle has been previously applied to the process of lipase production by *Y. lipolytica* in our previous work for the assessment of the impact of pH and dissolved oxygen fluctuations (Kar, 2008). A bioreactor operated under the MFM regime could be used as a good platform for the elaboration of a new scale-down system for the estimation of the impact of foam formation on microbial physiology.

## References

- Aldric, J. M., Gillet, S., Delvigne, F., Blecker, C., Lebeau, F., Manigat, G., Thonart, P., . 2009. Effect of surfactants and biomass on the gas-liquid mass transfer in an aqueous-silicone oil two-phase partitioning bioreactor using *Rhodococcus erythropolis* T902.1 to remove VOC from gaseous effluents. ***Journal of chemical technology and biotechnology***, 84: 1274-1283.
- Amaral, P., Colo, M., Coelho, M. A., Fontes, G., & Nele, M. 2009. Characterization of a bioemulsifier produced from glycerol and glucose by *Yarrowia lipolytica*. ***New Biotechnology***, 25(1): 138-138.
- Beopoulos, A., Cescut., J., Haddouche, R., Uribe Larrea, J.L., Molina-Jouve, C., Nicaud, J.M., . 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. ***Progress in lipid research***, 48: 375-387.
- Boon L.A., H. F. W. J. M. M., van der Lans R.G.J.M., Bujalski W., Wolff M.O., Nienow A.W. 2002. Comparing a range of impellers for "stirring as foam disruption". ***Biochemical engineering journal***, 10: 183-195.
- Chen, J. Y., Wen, C. M., & Chen, T. L. 1999. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. ***Biotechnology and Bioengineering***, 62(3): 311-316.
- Delvigne, F., Lecomte, J.P., 2010. Foam formation and control in bioreactors, ***Encyclopedia on industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technologies***: in press: Wiley.
- Destain, J., Fickers, P., Weeckers, F., Moreau, B., Thonart, P.,. 2005. Utilization of methyl oleate in production of microbial lipase. ***Applied biochemistry and biotechnology***, 121-124: 269-278.
- Elibol, M., & Ozer, D. 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. ***Process Biochemistry***, 36(4): 325-329.
- Enfors, S. O., Jahic, M., Rozkov, A., Xu, B., Hecker, M., Jürgen, B., Krüger, E., Schweder, T., Hamer, G., O'Beirne, D., Noisommit-Rizzi, N., Reuss, M., Boone, L., Hewitt, C., McFarlane, C., Nienow, A., Kovacs, T., Trägårdh, C., Fuchs, L., Revstedt, J., Friberg, P.C., Hjertager, B., Blomsten, G., Skogman, H., Hjort, S., Hoeks, F., Lin, H.Y., Neubauer, P., van der Lans, R., Luyben, K., Vrabel, P., Manelius, A. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. ***Journal of biotechnology***, 85: 175-185.
- Fickers, P., Destain, J., Thonart, P.,. 2005. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. ***Biotechnology letters***, 27: 1751-1754.

- Fickers P., O., M., Destain, J., Weekers, F., Thonart, P., . 2006. Production and downstream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and microbial technology**, 38: 756-759.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., . 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes : an overview. **Biotechnology advances**, 27(2): 153-176.
- Ghildyal N.P., L. B. K., Karanth N.G. 1988. Foam control in submerged fermentation : state of the art. **Advances in applied microbiology**, 33: 173-222.
- Guerzoni M.E., L. R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., Suzzi G. 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. **International journal of food microbiology**, 69: 79-89.
- Hewitt, C. J., Nienow, A.W.,. 2007. The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes, **Advances in applied microbiology**: 105-135: Vol. 62.
- Hoeks, F., Boon, LA, Studer, F, Wolff, MO, van der Schot, F, Vrabel, P, van der Lans, RGJM, Bujalski, W, Manelius, A, Blomsten, G, Hjorth, S, Prada, G, Luyben, KCAM, Nienow, AW,. 2003. Scale up of stirring as foam disruption (SAFD) to industrial scale **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, 30(2): 118-128
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Schimossek, K., Zonta, A., & Reetz, M. T. 1997. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 3(1-4): 3-12.
- Junker, B. 2007. Foam and Its Mitigation in Fermentation Systems. **Biotechnology progress**, 23: 767-784.
- Kar, T., Delvigne, F., Masson, M., Destain, J., Thonart, P.,. 2008. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, 35: 1053-1059.
- Kar, T., Destain, J., Thonart, P., & Delvigne, F. 2010. Impact of scaled-down on dissolved oxygen fluctuations at different levels of the lipase synthesis pathway of *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**, 14(S2): 523-529.
- Koch V., R. H. M., Schügerl K., Innertsberger E., Menzel H., Weis J. 1995. Effect of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors. **Process biochemistry**, 30(5): 435-446.
- Lee, S. Y., & Rhee, J. S. 1993. Production and Partial-Purification of a Lipase from *Pseudomonas-Putida* 3sk. **Enzyme and Microbial Technology**, 15(7): 617-623.
- Lopes, M., Gomes, N., Gonçalves, C., Coelho, M.A.Z., Mota, M., Belo, I.,. 2008. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. **Letters in applied microbiology**, 46: 255-260.
- Neubauer, P., Junne, S.,. 2010. Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. **Current opinion in biotechnology**, 21: 114-121.
- Parthasarathy, S., Das, T.R., Kumar, R., Gopalakrishnan, K.S. 1988. Foam separation of microbial cells. **Biotechnology and bioengineering**, 32: 174-183.
- Pilon L., V. R. 2004. Minimum superficial gas velocity for onset of foaming. **Chemical engineering and processing**, 43: 149-160.
- Prins A., v. t. R. K. 1987. Protein and surface effects in fermentation : foam, antifoam and mass transfer. **Trends in biotechnology**, 5: 296-301.
- Ruiz-Herrera, J., Sentandreu, R.,. 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. **Archives in microbiology**, 178: 477-483.
- Smita, S. Z., & Aditi, P. 2002. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, 42(1): 67-73.

- Szabo R., S. V. 2002. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS microbiology letters**, 206: 45-50.
- Van't Riet K., v. S. H. M. 1992. Foaming, mass transfer and mixing : interrelations in large scale fermentors. In M. R. L. a. A. Bose (Ed.), **Harnessing biotechnology for the 21st century**: 189-192. Washigton DC: American chemical society.
- Zinjarde, S. S., Pant, A., Deshpande, M.V.,. 1998. Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. **Mycological research**, 102(5): 553-558.

## Chapitre V

---

# Extrapolation du procédé de production de lipase

**Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :**

Kar, T., Destain, J., Thonart, P., Delvigne, F. (2011) Scale-down assessment of the sensitivity of *Yarrowia lipolytica* to the oxygen transfer and foam management: investigation of the underlying physiological mechanisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **in press**

# Extrapolation du procédé de production de lipase

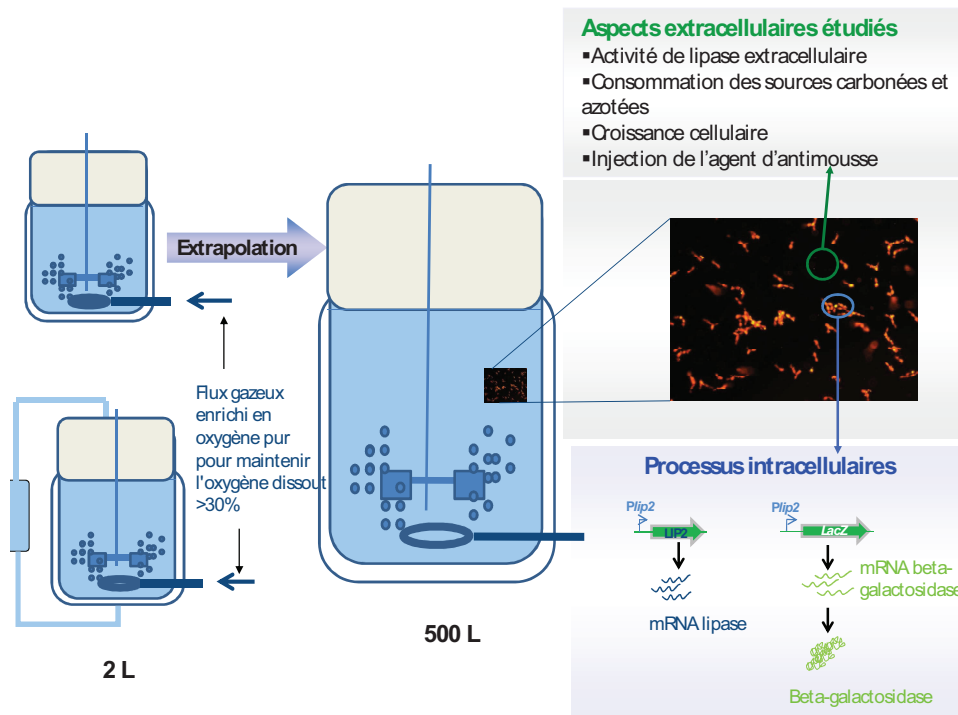
## Résumé

### ***Objectif et stratégie expérimental :***

Nous avons étudié précédemment l'effet de la variation de l'oxygène dissous lors de l'extrapolation en utilisant le concept du bioréacteur *scale-down*. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que pour une meilleure production de lipase, l'amélioration des conditions d'aération est la plus intéressante. Avant d'évaluer l'effet de l'extrapolation proprement dite, un système de régulation basé sur l'enrichissement du flux gazeux d'entrée en oxygène pur a été évalué afin d'optimiser le transfert d'oxygène tout en limitant la formation de mousse. Cette méthode a été appliquée aux bioréacteurs *scale-down* pour éliminer l'effet du manque d'oxygène dissous dans la partie agitée et se focaliser sur l'impact des limitations en oxygène dissous dans la partie non-agitée.

L'effet de l'extrapolation a été étudié sur plusieurs niveaux. En premier lieu, les analyses extracellulaires ont été effectuées pour évaluer les interactions physiologiques ou physicochimiques telles que : l'activité de la lipase extracellulaire, la croissance cellulaire, la consommation des nutriments (carbonés, azotés) et l'injection de l'agent d'antimousse. Ensuite, les processus intracellulaires ont été investigués, ce qui permet une connaissance approfondie de l'influence directe d'un facteur extérieur (la fluctuation de la concentration en oxygène dissous) sur la synthèse de lipase. Enfin, la physiologie des cellules individuelles a été étudiée en utilisant la cytométrie en flux. Cette technique permet de quantifier l'hétérogénéité d'une caractéristique cellulaire au sein d'une même population microbienne.

Le plan expérimental de cette partie du travail est schématisé au niveau de la figure suivante :



**Figure 1 :** Etude de l'extrapolation de la production de la lipase en utilisant un réacteur *scale-down* de 2 L et un réacteur pilote de 500 L sur plusieurs mécanismes physiologiques extracellulaires et intracellulaires

## Abstract

A scale-down investigation of the impact of local dissolved oxygen limitation on the lipase production by *Y. lipolytica* has been performed. One of the major issues encountered during this kind of process is the formation of foam requiring a reduction of the overall oxygen transfer efficiency of the system in order to keep antifoam consumption to a reasonable level. A regulation strategy involving the oxygen enrichment of the air flow rate through the reactor has allowed to partly overcome this issue. In a second time, the scale dependency of the process operated with air enrichment has been investigated by a combination of scale-down and pilot scale cultivation tests. The scale-down apparatus considered in this work comprised a well-mixed part connected to a plug-flow part subjected to dissolved oxygen limitation. Surprisingly, foaming intensity was greatly reduced in the case of the test performed in scale-down reactors (SDRs) while maintaining the same stirring and aeration intensities in the stirred part of the reactor. For a mean residence time of 100 s in the recycle loop of the reactor, foam formation is significantly reduced while cell growth and lipase production are both unaltered. When the residence time in the recycle loop is raised to 200 s, the foam phenomena is also reduced, but the lipase yield is altered as well as the *lip2* gene transcription and translation as shown by RT-qPCR and reporter gene activity respectively. Our results clearly show the importance of taking primarily into account cell physiology for the scaling-up procedure.

**Keywords:** scale-down, microbial stress, foam control, bioreactor

## Introduction

Scaling-up procedure of bioprocesses are generally fastidious considering the progressive loss of mixing efficiency with scale and the complex biological response that can be exhibited when microorganisms are exposed to the resulting heterogeneities (Enfors, 2001; Neubauer, 2010). This is especially true in the case of the lipase production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Indeed, this process involves strong issues both at the level of the physico-chemical system (i.e., the bioreactor) and at the level of the biological mechanisms involved in the lipase synthesis (Fickers, 2005a). The mixing efficiency is indeed critical in order to support the high oxygen demand of the microorganism and to provide an efficient dispersion of the hydrophobic substrate that is used as the principal carbon source for the synthesis of lipase (in our case, we use methyloleate as a renewable raw material that is recognized as an inducer for lipase excretion by *Y. lipolytica* (Destain, 2005; Fickers, 2005b). Our previous work has shown a critical relationship between the lipase yield and the dissolved oxygen level. More specifically, a significant reduction of the specific lipase production (i.e., amount of lipase produced in function of cell density) has been observed when cells are exposed to oxygen deprivation (Kar, 2008). While other environmental conditions such as pH and carbon source dispersion seems to have no impact at the level of the *lip2* activity, a significant reduction of this activity has been observed in the case of oxygen limitation (Kar, Destain, Thonart, & Delvigne, 2010). The complexity comes from the fact that in industrial bioreactors, cells are exposed to fluctuating oxygen concentration due to the formation of gradients (Zahradnik J., 2001). Microbial cells are able to exhibit very different responses involving either mRNA species, allosteric control of metabolic enzymes and synthesis of stress proteins in function of the amplitude and the frequency of these environmental fluctuations (Lara, Galindo, Ramirez, & Palomares, 2006; Müller, 2010; Patnaik, 2006). The aim of this work is to clarify which physiological level is affected in function of these environmental fluctuations. For this purpose, we have used a set of two-compartment scale-down bioreactor able to reproduce the



local exposure of microbial cells to dissolved oxygen limitation. These scale-down reactors (SDRs) have been designed by taking into account the fact that this kind of culture is subjected to severe foaming issues due to the release of a high amount of proteins during the process.

## **Materials and methods**

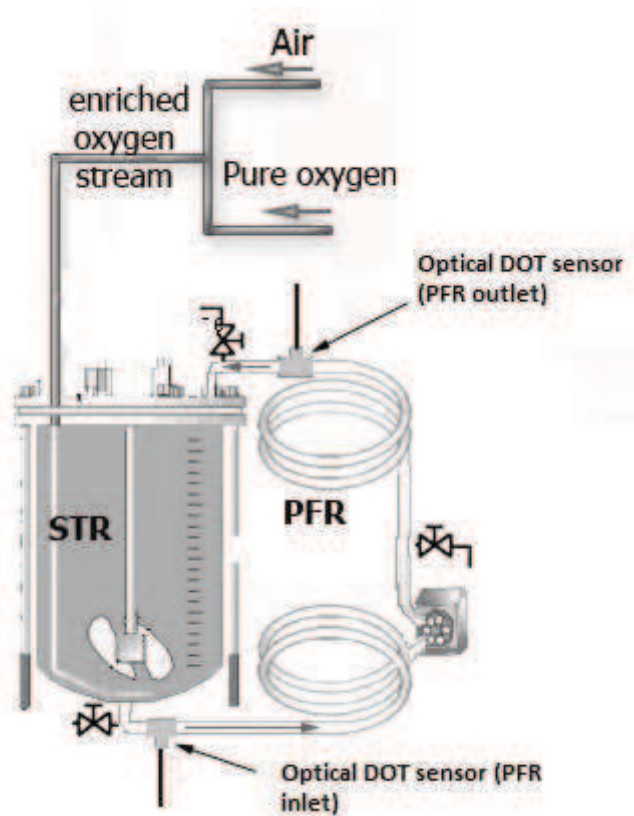
### **Strain and culture conditions**

*Yarrowia lipolytica* JMY775 was stored at -80 °C in working seeds vials (cells in suspension in glycerol solution 40%). The JMY775 strain has been obtained by genetic manipulation from a lipase overproducing strain (LgX64.81) modified with a *lip2-LacZ* reporter gene. Cells have been first precultivated in a 250-mL baffled shake flask containing 100 mL of medium containing glucose (20 g/L), tryptone N1 (10 g/L) (BHA, Belgium) and yeast extract (10 g/L). Following the precultivation step, the culture was transferred to the bioreactor. The cultivation media contains per liter: Agrimul 28 mL (Cognis, France), tryptone N1 7.5 g and yeast extract 7.5 g. During the experiments, pH was maintained at value of  $7 \pm 0.1$  by the addition of KOH 6 N or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6 N and temperature at 30 °C.

### **Bioreactor operations and scale-down experiments**

The laboratory scale bioreactor tests have been performed in Biostat B systems (Sartorius) with a working volume of 1.5 L and equipped with Rushton disk turbines with 6 blades RDT6 ( $d = 0.05$  m). Stirrer rate has been maintained at 700 rpm during the whole experiment. The foam has been controlled by an antifoam probe placed in the headspace of the reactor at 5 cm from the top of the vessel. Foam level has been controlled by the addition of polyether antifoam Tego KS911 (Goldschmidt, Germany). When activated, the antifoam control system releases antifoam pulse of 2.5 ml with an interval time between two pulses of 30 sec. Dissolved oxygen level has been continuously monitored with a dissolved oxygen probe (Mettler Toledo InPro 6800). For the first experiment in the well-mixed reactor, the air-flow

rate has been controlled at 0.7 volume of air per volume of culture per minute (vvm). For the other lab-scale experiments, oxygen-enriched air (OEA) has been used in order to cope with the increase of dissolved oxygen consumption. In the case of OEA-operated bioreactors, total gas flow rate has been maintained at 0.7 vvm, but the percentage of oxygen in total gas flow (v/v) has been automatically adjusted between 0 and 30% in order to keep DOT above 30%. The scale-down bioreactor used in this work comprises a well-mixed stirred tank reactor (STR) connected to a plug flow reactor (PFR) where an oxygen depleted zone is generated (Figure 1).



**Figure 1** : scheme of the scale-down reactor (SDR) configuration involved in this work

DOT at the inlet and at the outlet of the PFR has been measured by using a non-invasive optical sensor (Presens). The residence time in the PFR has been modulated in order to study the impact of two ranges of oxygen depletion. First, residence time inside the PFR has been fixed to 200 sec (SDR 200s). Three samples were taken each time along PFR for the

experiment in order to monitor the mRNA level at length corresponding to 0, 125 and 200 sec of residence time (see the section relative to RT-qPCR experiments for more details). Second, the residence time inside the PFR has been decreased to 100 sec (SDR 100s). Samples for the determination of the mRNA level have been taken at length corresponding to 0, 50, 100 sec of residence time respectively. These two SDR configurations allow to reproduce the classical range of variation of mixing time values expected for industrial bioreactors (mixing time in the range of 50 to 200s for industrial bioreactor running at an average dissipated power of 1 kW/m<sup>3</sup> (Delvigne, 2006; Vrabel, 2000)). Pilot plant experiment has been performed in a 500 L bioreactor (Biolaffite-France; D = 0.62 m) with a working volume of 350 L and equipped with 2 RDT4 rushton turbines (d = 0.27 m). Stirrer rate is maintained at 110 rpm. The air-flow rate was controlled at 0.7 volume of air per volume of culture per minute (vvm). A second precultivation step was carried out during 24 h in bioreactor containing 13 L of flask medium. After the precultivation steps, a calculated volume has been transferred to 500-L bioreactor while initial cells concentration in 500-L corresponds 2-L bioreactor during lag-phase. The mixing efficiency of the 500L bioreactor has been evaluated in a previous study (Delvigne, 2006). In the case of the operating conditions considered in this work, this reactor exhibits a mixing time of 24 sec.

### **Cell Dry Weight Determination**

Biomass yield has been determined after the elimination of the fatty fraction present in the cultivation medium. Fifteen millilitres of medium have been centrifuged at 10000×g for 20 min (Avanti J-25I, Beckman, USA). The supernatant has been eliminated, and the harvested cells have been washed twice time with water and detergent 2%. Biomass concentration has been estimated on the basis of the cell dry weight (CDW). Cells coming from a culture sample of 15 mL have been recovered by filtration under vacuum by using hydrophobic

polyethersulfone filters (0.45  $\mu\text{m}$ , Pall Life Sciences, USA). The filters have been then directly placed in aluminium dishes and dried at 105 °C for 24 h.

### **Extracellular lipase activity and intracellular lip2 level of induction**

The extracellular lipase activity is determined as follows: samples of the culture medium are withdrawn at various times of fermentation, centrifuged for 20 min at 10,000 g. The supernatant is then used for the extracellular lipase activity estimation using an olive oil emulsion as the enzyme substrate (olive oil 25%, 0.1 M NaOH 7.5%, polyvinyl alcohol (2%) 67.5%). The enzymatic reaction is initiated by adding 1 mL of supernatant to 4 mL of emulsion with 5 mL of 0.1 M of phosphate buffer at pH 7. The enzymatic reaction is maintained for 15 min at 37 °C on a rotary shaker (150 rpm) and is subsequently stopped by the addition 20 mL of acetone–ethanol mix [1:1(v/v)]. The free fatty acids released during the reaction are then titrated with 0.05 M NaOH. One unit of lipase activity is defined as the amount of lipase inducing the release of 1 mmol of fatty acid per minute at 37 °C and pH 7. The translation level of lipase mRNA is performed on the basis of the parallel synthesis  $\beta$ -galactosidase by the LIP2–LacZ reporter gene JMY775 strain. The  $\beta$ -galactosidase activity, expressed in Miller unit/mg dry material, Miller unit being defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu\text{mol}$  of o-nitrophenol (subsequent to the hydrolysis of the ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactosidase ONPG) per minute and per 1 mg dry material at 37 °C. The dry matter has been used instead of the optical density at 600 nm to measure the  $\beta$ -galactosidase activity in order to avoid bias attributed to the presence of methyl oleate in the samples. The  $\beta$ -galactosidase is extracted from the microbial cells by a chloroform permeabilization procedure as described previously (Kar, 2008).

### **Total carbon and nitrogen sources assay**

In order to determine the concentration of the respective fatty acids present in the broth, 10 mg of each commercial fatty acid, i.e. palmitic acid C16, stearic acid C18, oleic acid 18:1,

linoleic acid 18:2 and linolenic acid 18:3 (Sigma– Aldrich) have been dissolved in 100 ml of acetone and have been used as internal standard. Gas chromatography analysis have been performed using a 5890 series II gas chromatograph from Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionisation detector and an Alltech AT AQUAWAX column (30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25  $\mu$ m). The oven temperature was held at 40°C for 2 min, raised to 165°C at a rate of 1°C/min, raised to 250°C at a rate of 2.5°C/min and finally fixed at 250°C for 20 min. The injector and detector temperatures were 200 and 250°C, respectively. The flow of carrier gas (helium) was adjusted to a linear velocity of 1 ml/min at a pressure of 0.5 bar. One  $\mu$ L of samples were injected into the GC apparatus.

#### **Extraction and purification of total RNA**

A culture sample of 15 mL was filtered under vacuum through 0.45  $\mu$ m pore size filters. The filters have been placed in a Falcon tube and conserved directly in the liquid nitrogen to avoid the mRNA degradation. Then, the filters were conserved at -80°C. The E.Z.N.A.TM Yeast RNA Kit ( OMEGA bio-tek®) was used to extract the RNA. DNase treatment was done to RNA samples using Turbo DNA-freeTM Kit (Applied Biosystems) to remove the contaminating DNA from RNA preparation. RNA quality and quantification were analyzed using a GenesysTM Spectrophotometer. The cDNAs were subsequently synthesized using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems).

#### **Real-time quantitative PCR**

The primers for real-time PCR were designed to have a length of about 20-25 bases, a G/C content of over 50%, and a T<sub>m</sub> of about 60°C. The length of the PCR products ranged between 90 and 150 bp. LightCyclerTM 163 software (Roche, Mannheim, Germany) was used to select primer sequences. The sequences of the primer encode the gene of Actin *ACT-R* (GGCCAGCCATATCGAGTCGCA), *ACT-F* (TCCAGGCCGTCCTCTCCC) (Mansour, Bailly, Delettre, & Bonnarme, 2009). The sequences of the primer encode the gene of Lip2

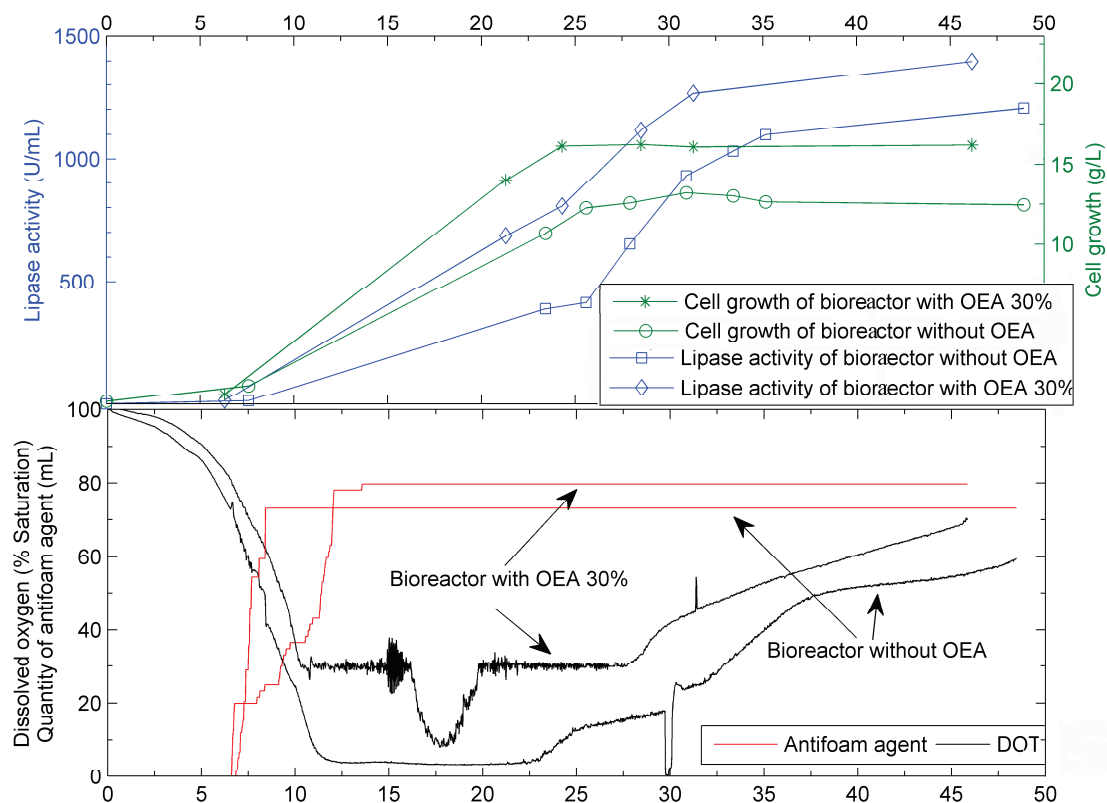
*LIP2-R* (ATCTGGTAGTCGGGATACTG), *LIP2-F* (TTGATCTTGCTGCTAACATC). All the primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). The SYBR green I PCR amplification was performed using a POWER SYBR® GREEN PCR (Applied Biosystems). The Amplification was carried out in a 25- $\mu$ l (final volume) mixture containing 1000 ng of RNA sample, 0.3  $\mu$ M of primer, and 12.5  $\mu$ l of POWER SYBR® GREEN PCR (Applied Biosystems). A negative control without cDNA added was systematically included. Real-time PCR is performed on instrument StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The experimental design is done by using the program StepOne™ Software v2.0.1 installed on a PC connected to the instrument; we used mode SYBR Green Reagents and Quantitation - Comparative CT ( $\Delta\Delta$ CT). The same program was used to determine the threshold cycle (CT) values. The amplification procedure involved an incubation step at 95°C for 10 min for the initial denaturation, followed by 41 cycles consisting of a denaturation step at 95°C for 15 s, followed by a step at 60 °C for 1 min. After the real-time PCR run, a melting curve analysis was performed by continuously measuring fluorescence during a temperature upshift from 60 to 95°C at a transition rate of 0.3°C/s. Standard curves were generated by plotting the CT values as a function of the initial RNA concentration log. PCR efficiency (E) was then calculated using the following formula:  $E=10^{-1/\text{slope}}$ . Four dilution of cDNA were prepared to determine the real time PCR efficiencies. The Actin gene was chosen as a suitable internal control gene to normalize the results. The Pfaffl method was used to calculate the fold change in transcript abundance normalized to the Actin gene and relative to the sample collected at the beginning of the cultivation process (T1). For each RT-qPCR experiments, statistical analysis has been performed on the basis of three independent experiments. Standard deviations were less than 10% of average value. Data of the mRNA analysis are expressed as means ( $\pm$ SEM) of at least three independent samples. Comparisons of different samples were made using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test with GraphPad

Prism (v. 4) software. The degree of significance was set at  $p > 0.05$  in order to evaluate differences between mRNA level.

## **Results and discussion**

### **Effect of the air oxygen enrichment strategy on lipase production**

Generally foam related issues arise when the air flow rate is increased in order to cope with the amount of dissolved oxygen required for microbial growth and metabolites synthesis. This important consideration leads to a technical solution consisting in the reduction of the air flow rate in order to find a compromise between oxygen requirement and foam formation issues, including the injection of large quantities of chemical antifoam with the resulting adverse effects. In order to estimate the physiological impact of this technical solution, two different experiments have been carried out in well-mixed, lab-scale bioreactors. The first test involves a bioreactor in which severe foaming issues (considering the amount of chemical antifoam used) and oxygen limitation are observed. The second test involves a bioreactor with the same operating conditions (stirrer speed and air flow rate) but with progressive oxygen-enriched air (OEA) in order to maintain a dissolved oxygen level of 30% during the culture. In these conditions, the consumption of chemical antifoam is nearly the same in the two cases (Figure 2), but with a more progressive addition in the case of the bioreactor operated with OEA.



**Figure 2 :** impact of the air oxygen enrichment strategy (AOE) on antifoam consumption, cell growth and lipase production

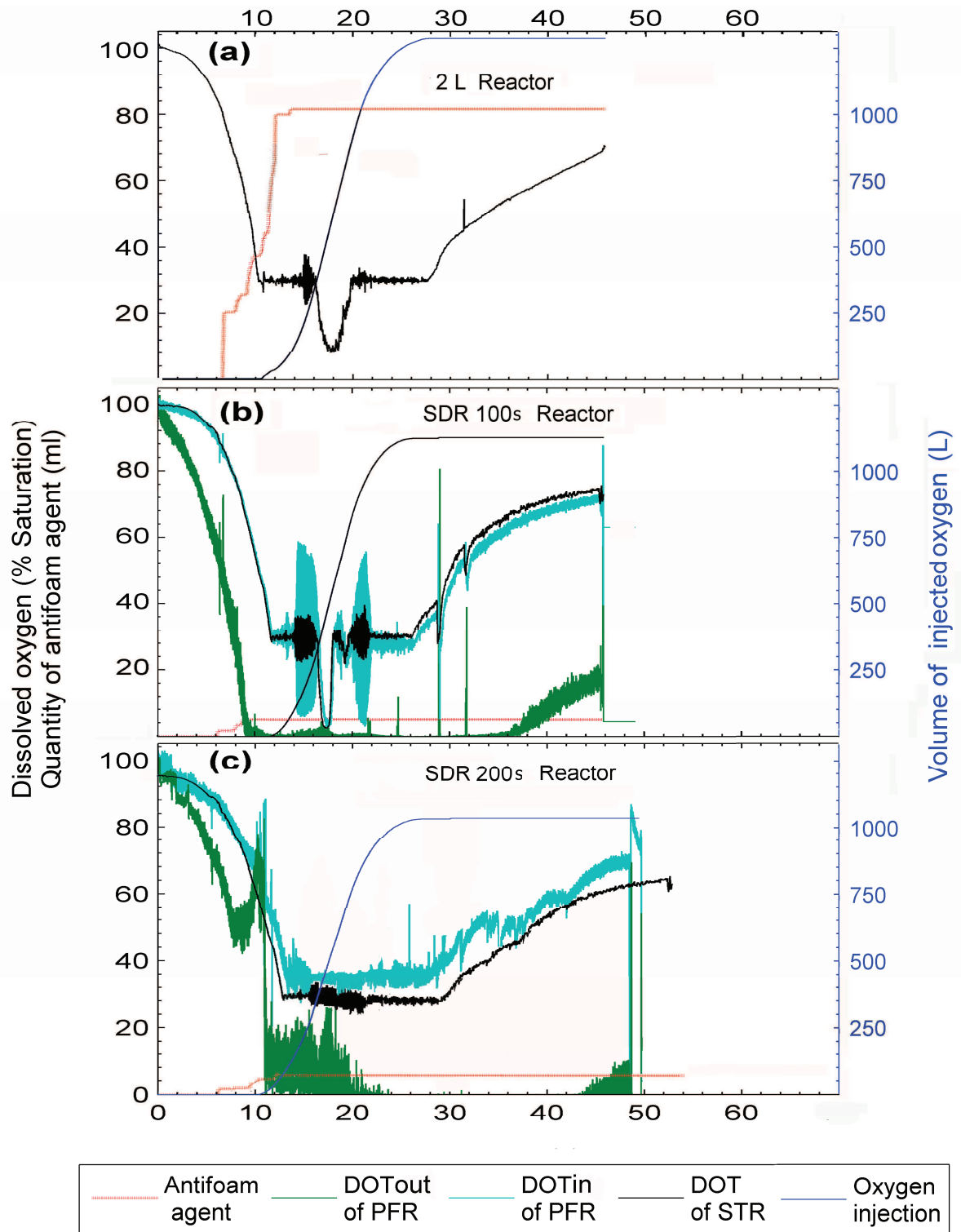
This observation is obvious since the air flow rate is the same for the two experiments. However, the OEA allows to avoid oxygen limitation and the resulting cell growth and lipase production are more elevated than in the case of the bioreactor performed without oxygen enrichment. For the two cases, the injection of chemical antifoam begins 5 hours after inoculation, corresponding to the beginning of the exponential phase of growth. This phenomenon can be related to the induction of biosurfactant synthesis and protein leakage by *Y. lipolytica* cells in presence of hydrophobic substrate. However, the specific lipase production is the same in the two cases (ratio between lipase activity and cell density, results not directly shown), indicating that no extreme microbial stress is encountered in our operating conditions. Indeed, our previous work has shown that severe oxygen limitation induces a drop at the level of the specific lipase production (Kar, 2008). In order to avoid the



potential impact of microbial stress resulting from oxygen starvation, OEA operated bioreactor will be considered as a reference test in the following experiments.

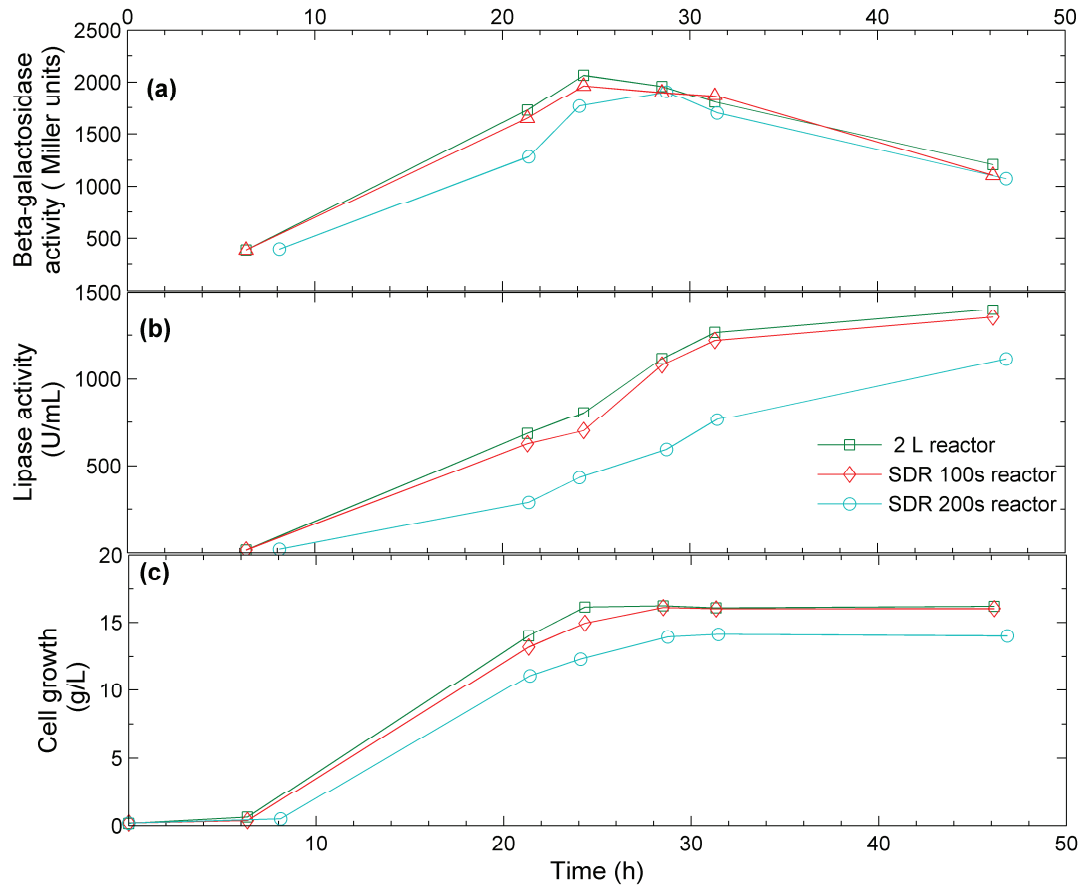
### **Scale-down effect on the oxygen transfer management and related physiological impact**

Four cultivation strategies have been considered in order to investigate the effect of oxygen deficiency and DOT perturbations on physicochemical and physiological response during scale-up. First, a culture in a 2L well-mixed bioreactor has been performed with an OEA control and will be used as a reference for the reasons mentioned in the previous paragraph. Second, two scale-down reactor (SDR) tests will be performed in order to investigate stress responses when cells are exposed to local oxygen limitation. Cyclic perturbations at the level of dissolved oxygen level have been generated by connecting the stirred bioreactor to a plug-flow reactor (PFR). Scaled-down operating conditions have been modulated at the level of the recirculation flow rate between the stirred vessel and the PFR leading to two distinct mean residence time at the level of the PFR of 100 seconds and 200 seconds respectively. The DOT profiles recorded in the case of the well-mixed reactor and the SDR 100s are very similar (Figure 3a and 3b).



**Figure 3 :** dissolved oxygen profiles and antifoam consumption for A : a well-mixed, lab-scale bioreactor B : a SDR with a mean residence time of 100s in the recycle loop (DOT profiles at the inlet and at the outlet of the recycle loop shown) C : a SDR with a mean residence time of 200s in the recycle loop (DOT profiles at the inlet and at the outlet of the recycle loop shown)

Indeed the DOT level is maintained above 30% by the OEA control, except for a period comprised between 16 and 18 hours of culture. This period corresponds to a high oxygen demand as shown by the profile of pure oxygen injection. This phenomenon has not been observed in the case of the SDR 200s (Figure 3c). The second critical parameter for the process is the consumption of chemical antifoam. An excessive consumption of antifoam agent (80 mL) was observed in the case of the well-mixed reactor, but not in the case of the reactors operated under reduced mixing efficiency, i.e. the SDRs and the pilot plant reactor (5 mL in the case of SDR 100s, 5.4 mL in the case of the SDR 200s). This phenomenon can be attributed to the fact that the reduction of the mixing efficiency and the exposition of microbial cells to heterogeneities lead to a physiological response decreasing the formation of foam. However, oxygen transfer conditions in the well-mixed reactor and in the SDR 100s are very similar as shown by the DOT profiles (Figures 3a and 3b). The microbial performances are also very similar, as shown by lipase yield and biomass growth for these two conditions (Figure 4b and 4c). However, when mixing conditions are altered beyond a given level, i.e. in our case by increasing the residence time in the PFR to 200 s, there is a clear reduction of extracellular lipase activity and cell growth. On the other hand, the intracellular lipase activity (evaluated on the basis of the *lip2 lacZ* reporter system) is similar for all the cultures performed in lab-scale reactor and in SDRs (Figure 4a).



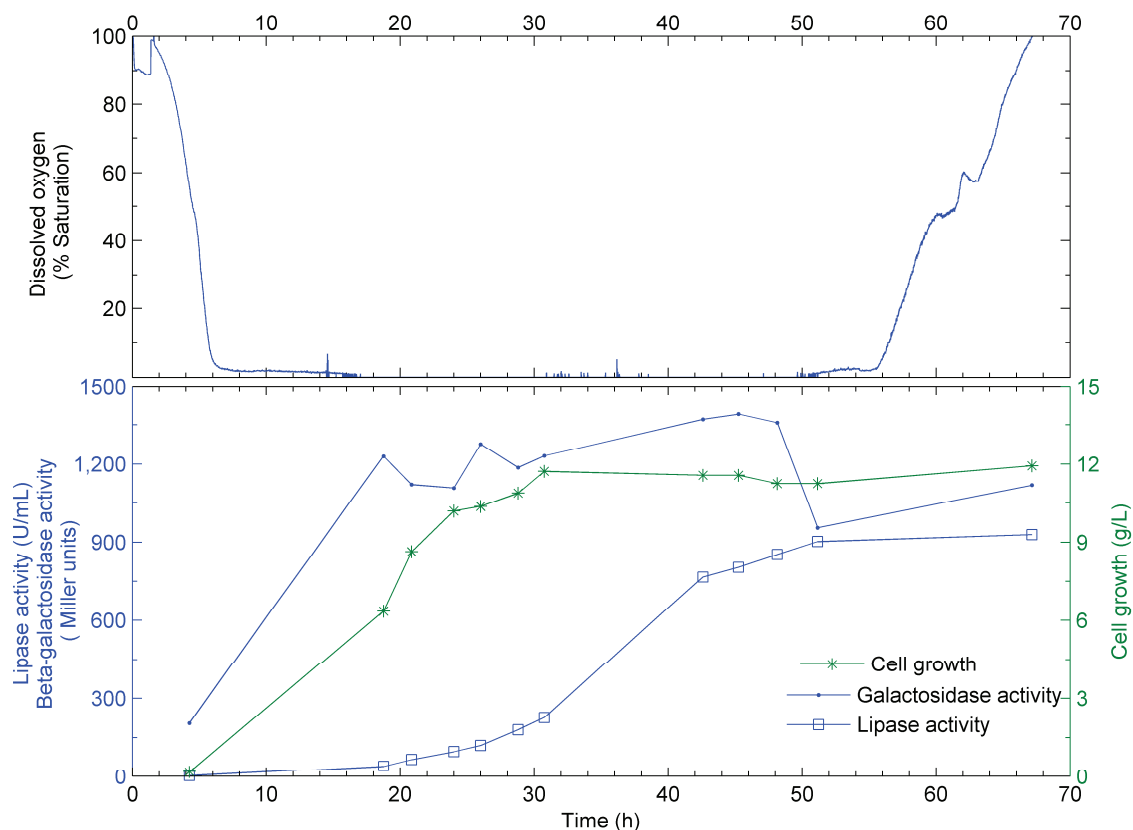
**Figure 4 :** A : lip2:lacZ intracellular activity B: extracellular lipase activity C : microbial growth for the 2L reference bioreactor, the SDR 100sec and the SDR 200sec

Indeed, our previous work has shown that the impact of stress on *lip2* expression level is only recorded in case of extreme oxygen starvation (Kar, 2008), which is not the case here according to the DOT profiles (Figure 3a, 3b and 3c). For the cell growth and extracellular lipase activity recorded for the pilot plant reactor, the results are similar to those obtained in the case of the SDR 200s, i.e. a significant drop by comparison to the well-mixed case and the SDR 100s. The most interesting result provided by these tests is the significantly lower consumption of chemical antifoam in the SDRs and in the pilot plant reactor. This observation cannot be explained by the lower aeration intensity in the case of the SDR tests. This unexpected result leads to the conclusion that more complex phenomena are involved in the process of lipase production by *Y. lipolytica* and is of primary importance for the scaling-up procedure. Indeed, these procedures are often established by maintaining the same volume of

air injected in the reacting vessel (Junker, 2004, 2007). This particular procedure induces an increase of the foaming issues with scale, considering that foam formation is related to the air superficial velocity and not to the air injected per unit of volume (during a classical scaling-up procedure for strict aerobic processes,  $G/V$  is maintained constant whereas  $G/S$  is proportional to the foam formation intensity,  $G$  being the air flow rate in  $\text{m}^3/\text{s}$ ,  $V$  the reacting volume in  $\text{m}^3$  and  $S$  the surface area of the reactor in  $\text{m}^2$ ). Thus, on the basis of the chemical engineering rules, the scale-up of the lipase production process would lead to an increase of the foam-related issues. On the other hand, the scale-down tests have shown that a physiological mechanism lead to a drastic reduction of this kind of issue, as noticed by a reduced antifoam consumption. In order to assess this hypothesis, a test in a 500L pilot scale-bioreactor has been performed and will be analysed in the next section.

#### **Confirmation of the results at the level of a pilot-scale, oxygen deficient bioreactor**

In order to practically assess the effect observed in scale-down bioreactors, a 500 L pilot plant bioreactor without OEA control has been considered in order to evaluate the effect of scale-up on the physiology of lipase production. The pilot plant reactor test has been operated under standard dissipated power (approximately  $5\text{kW}/\text{m}^3$ ). In these conditions, oxygen transfer is not sufficient as observed at the level of the DOT profile showing oxygen limitation after 6 hours for the remaining of the process (Figure 5).



**Figure 5 :** evolution of the main cultivation parameters for the test conducted in the 500L pilot-scale bioreactor

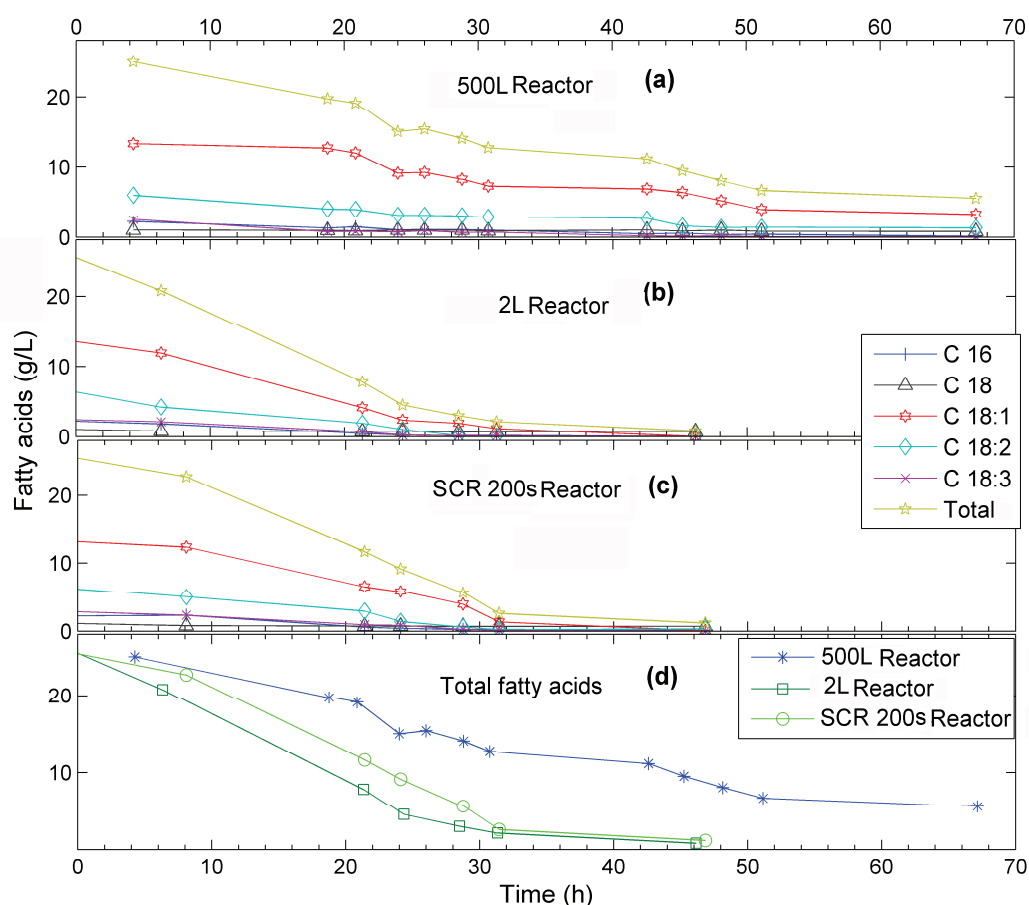
The mixing time value previously recorded in another work (Delvigne, 2006) has a value of 24 s under the operating conditions considered. This value can be considered to be very low by comparison with typical mixing time value encountered in large-scale bioreactors, but even at this scale dissolved oxygen gradients can be found. The dissolved oxygen probe is located near the wall of the bioreactor and more elevated values have to be expected in the vicinity of the impellers. If the classical scale-up rules are followed, an increase of the foaming issues has to be expected. Indeed, 0.7 vvm of air has been considered as a scale-up facto between the tests conducted in the 2L reference bioreactor and the 500L pilot scale bioreactor. It leads to a superficial gas velocity (ratio between the air flow rate and the bioreactor cross sectional area  $G/S$ ) of 0.0088 m/s in the case of the lab-scale bioreactor and of 0.0716 m/s in the case of the pilot-scale bioreactor. The air superficial velocity is thus

increased by a 10 factor when the culture is up-scaled to a volume of 500L. If it is considered that the rate of foam formation is proportional to the gas superficial velocity, a significant increase of foam formation has to be expected at the 500L scale. However, only 1600 mL of antifoam have been consumed during the culture (results not shown), corresponding to a ratio of 4 mL of antifoam per mL of reacting medium. In the case of the tests conducted in SDR, this ratio was on the range of 2-3 mL of antifoam per mL of reacting medium, and 75 mL of antifoam per mL of medium in the case of the 2L reference bioreactor. This result confirms the fact that in heterogeneous reactor, the foaming issues become very limited and are strongly dependent on the microbial physiology. However, a significant reduction for all the cultivations parameters, i.e. the lipase yield and cell growth, have been observed for the pilot-plant bioreactor, by comparison with the other operating conditions considered in this work, these observations being linked with more severe dissolved oxygen limitation (Figure 5). This observation is supported by the response of the *lip2* reporter system which seems to be affected only in the case of the pilot-plant reactor. Since there is a practical interest in understanding these phenomena for the reduction of foam formation and process intensification, a particular attention will be given to the dynamics of hydrophobic substrate consumption as well as on the molecular aspect behind lipase induction.

#### **Impact of process conditions on the consumption of the carbon and nitrogen sources**

All the cultivation experiments considered in this work have been performed by using a low-cost hydrophobic carbon source, i.e. a by-product of the surfactant industry containing mainly methylolate. This carbon source exhibits a complex composition involving different fatty acids. Since the different fatty acids are removed at distinct rates from the medium and incorporated into the cell (Guerzoni M.E., 2001), it could be an interesting parameter to follow in order to characterize the impact of scale-down conditions. Fatty acids incorporated inside the yeast cell are either selectively used for energy and for carbon source or after

eventual bioconversion into storage materials (Beopoulos, 2009b, a). To better understand the scale-down effect on the assimilation of fatty acids, GC analyses have been performed at various time points during the cultures (Figure 6).



**Figure 6 :** evolution of the different fatty acids fractions in different bioreactor configurations. The essential fatty acids of the carbon source used in this work are: C16 Palmitic acid, C18 Stearic acid, 18:1 Oleic acid, 18:2 Linoleic acid, 18:3 Linolenic acid.

Considering fatty acids consumption, it seems that *Y.lipolytica* consumed preferably C18:1, C18:2 and C18:3, the C16 and C18 being consumed to a less extent. This observation hold for the experiment performed in well-mixed reactor and in SDR 200s, indicating that fatty acids selection is not influenced by mixing performances in these operating conditions. Unsaturated C18 fatty acids are preferentially oxidized for growth requirements. These observations are in accordance with the literature. Unsaturated fatty acids are completely exhausted at the end of culture, while C16 and C18 remain for a large part in the broth (only

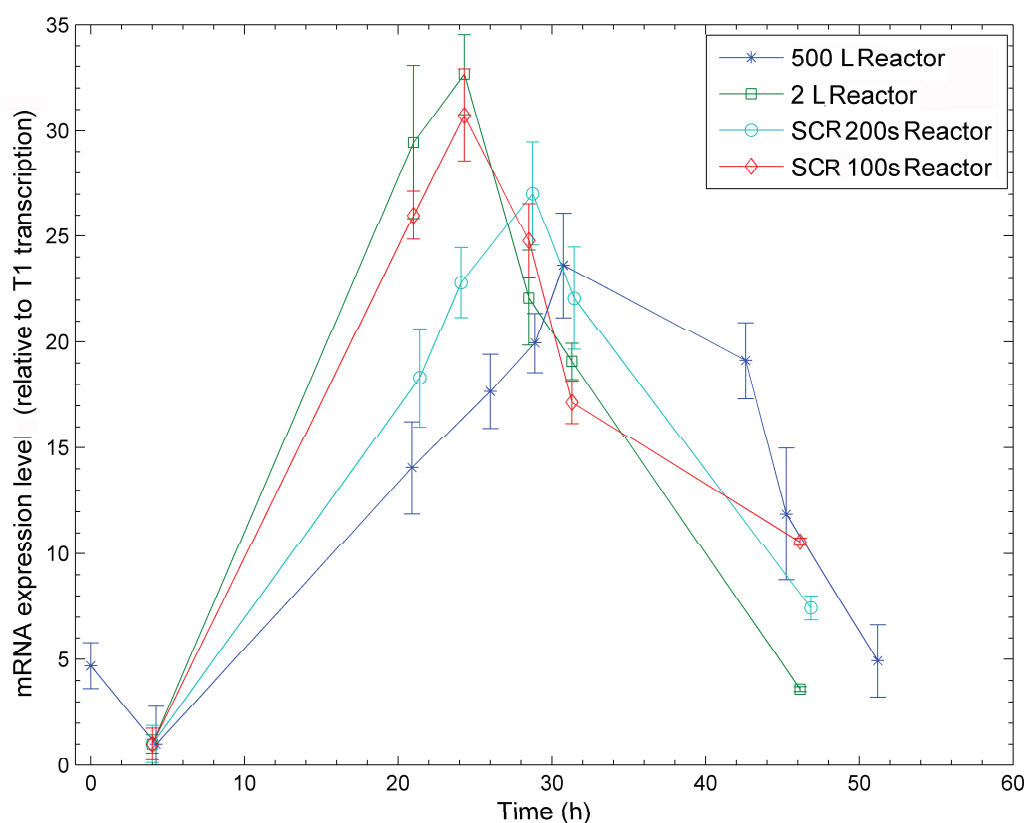


30 to 40% of these fatty acids are consumed during the process) and cannot be consumed as an energy source by *Y. lipolytica*. On the other hand, the hydrophobic carbon source is not fully consumed in the case of the culture performed in the pilot plant bioreactor and a large portion of both saturated and unsaturated fatty acids remains in the broth at the end of the culture (Figures 6a and 6d). Nitrogen source could also be another limiting factor. Total nitrogen has been tested and the results obtained in classical and scale-down bioreactors indicate that around 40% from the initial total nitrogen content was not consumed and remain in the broth at the end of the culture (results not shown). In the case of the cultures performed in lab-scale bioreactor and in SDRs, the carbon source is completely assimilated at the end of the culture, whereas nitrogen source is in excess and a significant amount remains in the broth. On the other hand, carbon source is not completely assimilated in the case of the culture performed in pilot-plant reactor, explaining the lower lipase yield observed in this case. This observation has to be put in relation with the extreme oxygen limitation encountered in this reactor. The differences of the use of nitrogen and fatty acids during the cultures in bioreactor could explain the significant drop of foam formation between a well-mixed intensive bioreactor and a bioreactor exhibiting oxygen deficiencies. Indeed, proteins tend to stabilize the foam, whereas fatty acids act as antifoam (Delvigne, 2010; Etoc, 2006; Vardar-Sukan F., 1998). Accordingly, in the pilot scale bioreactor exhibiting strong mixing and oxygen transfer deficiencies, the rate of fatty acids consumption is very low compared to the test performed in well-mixed conditions.

#### **Investigating another timescale : scale-down effect on *lip2* mRNA expression level**

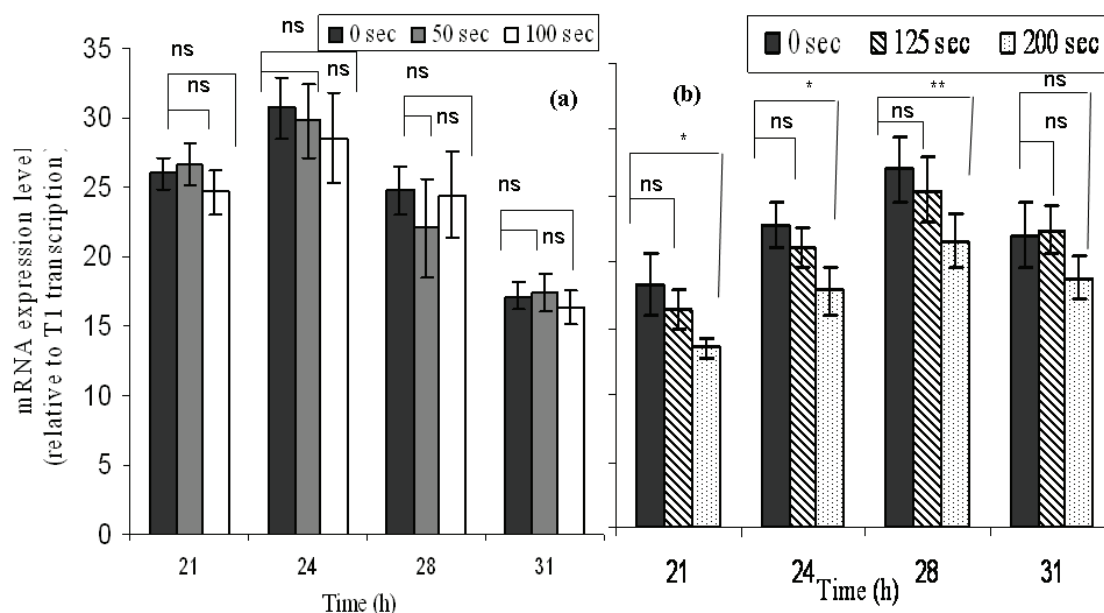
Considering the characteristic time scales involved in the exposure of cells to oxygen deprivation stress in SDRs, the *β-gal* reporter assay is not the best suited one. Indeed, exposure time in order of a few minutes in the bioreactors made it difficult to analyse the stress responses at the level of the dynamics of protein synthesis. Indeed, the characteristic

time for protein synthesis is within the range of 4-100 min (Patnaik, 2006), compared with the recirculation time in the PFR of the SDRs which is within the range of 100-200 s. Instead, transcriptional analysis has been used in order to overcome the difficulty associated with the lag time when analyzing the physiological responses at the protein or translational level. In a recent work, the influence of DOT fluctuation has been characterized on the basis of the quantification of mRNA levels coding for the *lip2* gene (Kar et al., 2010). The results obtained showed clearly that the mRNA level is influenced by oxygen deficiency. The qRT-PCR technique has been applied for all the bioreactor configurations considered in this work in order to estimate the mRNA expression level (Figure 7).



**Figure 7 :** RT-qPCR profiles of the *lip2* mRNA level for the different bioreactor configurations (the numbers of mRNA copies of samples were normalized to T1 at each time).

The lowest *lip2* mRNA concentration has been observed in the case of the pilot plant bioreactor for which oxygen limitation is the most intensive. No significant differences have been noticed for the test conducted in well-mixed bioreactor and in SDR 100s. This observation points out that a mean residence time of 100 seconds inside the recycle loop of the SDR is not sufficient to produce a noticeable stress response at the level of the lipase induction. This results is supported by the others performances parameters, i.e. cell growth and extracellular lipase (Figure 2). On the other hand, a drop at the level of *lip2* expression level is observed when the mean residence time is raised up to 200 seconds. Again, this effect is also observed at the level of the macroscopic variables such as cell growth and extracellular lipase activity. The instantaneous *lip2* expression level has also been quantified locally at different level of the recycle loop of the SDR (Figure 8).



**Figure 8 :** RT-qPCR profiles of the *lip2* mRNA level at different locations in the SDRs. A : first series of analyses in PFR for SC 100sc . B : second series for SC 200sc. The data represent the mean ( $\pm$ SD) of four independent analyses. Comparisons of means were made using a one-way ANOVA followed by Bonferroni's test (\* =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p > 0.01$  and ns = not significant).

This method allows the investigation of the impact of oxygen depletion at given residence when cells progress through the recycle loop. The concentration of *lip2* mRNA has been analyzed by groups of samples at different cultivation periods (21, 24, 28 and 31 hours). Samples have been withdrawn at the level of three distinct ports along the PFR for each group of analyses, corresponding respectively to a residence time of 0, 50 and 100 seconds for the SDR 100s and to 0, 125 and 200 seconds for the SDR 200s. No significant alteration of *lip2* expression has been observed for the culture conducted in the SDR 100s. However, a drop of *lip2* mRNA level is observed for the SDR 200s in the case of residence times exceeding 125 seconds. This observation must be correlated to the respective synthesis time of the *lip2* mRNA as well as its half-life.

## Conclusion

The production of lipase by *Y. lipolytica* is highly dependent on the oxygen availability in the bioreactor, and to a larger extent to the way that oxygen transfer is managed in function of the foam control process. Oxygen air enrichment control has a positive impact on the total amount of lipase produced during the process and allows to cope with foaming issues while maintained a sufficient DOT level in the broth. The scale dependency of the OEA operated process has been investigated by a combination of scale-down and pilot scale cultivation tests. Surprisingly, foaming intensity was greatly reduced in the case of the test performed in SDRs while maintaining the same stirring and aeration intensities in the stirred part of the reactor. For a mean residence time of 100s in the recycle loop of the reactor, foam formation is significantly reduced while cell growth and lipase production are unaltered. When the residence time in the recycle loop is raised to 200 s, the foam phenomena is also reduced, but the lipase yield is altered as well as the *lip2* gene transcription and translation as shown by RT-qPCR and reporter gene activity respectively. A test performed in a 500L pilot-plant bioreactor exhibiting mixing deficiencies has confirmed this result. Our results clearly show

the importance of taking primarily into account cell physiology for the scaling-up procedure. The direct physiological parameters, i.e. *lip2* gene expression and translation, affects the global yield of the process, whereas the indirect physiological parameters, i.e. the exposure of cells to dissolved oxygen heterogeneities, influence the formation of foam and thus the oxygen transfer management in the reactor. Our results can be exploited in order to improve the oxygen transfer management for the lipase production by *Y. lipolytica*. Indeed, cycles involved short oxygen limitation phase (< 100s) could be implemented in order to reduce foaming issues when keeping the same lipase yield.

## References

- Beopoulos, A., Cescut., J., Haddouche, R., Uribe-larrea, J.L., Molina-Jouve, C., Nicaud, J.M., . 2009a. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. ***Progress in lipid research***, 48: 375-387.
- Beopoulos, A., Chardot, T., Nicaud, J.M., 2009b. *Yarrowia lipolytica* : a model and tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. ***Biochimie***, 91: 692-696.
- Delvigne, F., Destain, J., Thonart, P.,. 2006. A methodology for the design of scale-down bioreactors by the use of mixing and circulation stochastic models. ***Biochemical engineering journal***, 28(3): 256-268.
- Delvigne, F., Lecomte, J.P.,. 2010. Foam formation and control in bioreactors, ***Encyclopedia on industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technologies***: in press: Wiley.
- Destain, J., Fickers, P., Weeckers, F., Moreau, B., Thonart, P.,. 2005. Utilization of methyl oleate in production of microbial lipase. ***Applied biochemistry and biotechnology***, 121-124: 269-278.
- Enfors, S. O., Jahic, M., Rozkov, A., Xu, B., Hecker, M., Jürgen, B., Krüger, E., Schweder, T., Hamer, G., O'Beirne, D., Noisommit-Rizzi, N., Reuss, M., Boone, L., Hewitt, C., McFarlane, C., Nienow, A., Kovacs, T., Trägårdh, C., Fuchs, L., Revstedt, J., Friberg, P.C., Hjertager, B., Blomsten, G., Skogman, H., Hjort, S., Hoeks, F., Lin, H.Y., Neubauer, P., van der Lans, R., Luyben, K., Vrabel, P., Manelius, A. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. ***Journal of biotechnology***, 85: 175-185.
- Etoc, A., Delvigne, F., Lecomte, J.P., Thonart, P.,. 2006. Foam control in fermentation bioprocess : from simple aeration tests to bioreactor. ***Applied biochemistry and biotechnology***, 129-132: 392-404.
- Fickers, P., Benetti, P.-H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S., Nicaud, J.-M., . 2005a. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications. ***FEMS yeast research***, 5: 527–543.
- Fickers, P., Destain, J., Thonart, P.,. 2005b. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. ***Biotechnology letters***, 27: 1751-1754.

- Guerzoni M.E., L. R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., Suzzi G. 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International journal of food microbiology*, 69: 79-89.
- Junker, B. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97(6): 347-364.
- Junker, B. 2007. Foam and Its Mitigation in Fermentation Systems. *Biotechnology progress*, 23: 767-784.
- Kar, T., Delvigne, F., Masson, M., Destain, J., Thonart, P.,. 2008. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(9): 1053-1059.
- Kar, T., Destain, J., Thonart, P., & Delvigne, F. 2010. Impact of scaled-down on dissolved oxygen fluctuations at different levels of the lipase synthesis pathway of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14(S2): 523-529.
- Lara, A. R., Galindo, E., Ramirez, O. T., & Palomares, L. A. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors. *Molecular Biotechnology*, 34(3): 355-381.
- Mansour, S., Bailly, J., Delettre, J., & Bonnarme, P. 2009. A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *PROTEOMICS*, 9(20): 4714-4725.
- Müller, S., Harms, H., Bley, T.,. 2010. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. *Current opinion in biotechnology*, 21: 100-113.
- Neubauer, P., Junne, S.,. 2010. Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Current opinion in biotechnology*, 21: 114-121.
- Patnaik, P. R. 2006. External, extrinsic and intrinsic noise in cellular systems : analogies and implications for protein synthesis. *Biotechnology and molecular biology review*, 1(4): 121-127.
- Vardar-Sukan F. 1998. Foaming : consequences, prevention and destruction. *Biotechnology advances*, 16(5/6): 913-948.
- Vrabel, P., van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.Ch.A.M., Boon, L., Nienow, A.N.,. 2000. Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers : modelling and measurements. *Chemical engineering science*, 55: 5881-5896.
- Zahradnik J., M. R., Fialova M., Vlaev D., Vlaev S.D., Lossev V., Seichter P. 2001. A network-of-zones analysis of mixing and mass transfer in three industrial bioreactors. *Chemical engineering science*, 56: 485-492.

## Chapitre VI

---

# Discussion générale, conclusions et perspectives

## Présentation des principaux résultats

Ce travail a permis de mettre en place, pour la première fois, une procédure globale, chez *Yarrowia lipolytica*, des processus physico-chimiques et biologiques associés à la production de lipase. Cette étude a été réalisée en réacteurs de laboratoire, mais aussi en réacteurs industriels, en se basant sur une approche *scale-down*. Il est composé de 4 chapitres reprenant chacun un axe important des recherches menées dans le cadre de ce travail :

- Identification des facteurs extracellulaires ayant une influence lors de l'extrapolation du procédé (**chapitre 2**). Cette étape d'identification a permis de mettre en évidence que les fluctuations locales des performances de transfert d'oxygène ont une influence prépondérante lors de l'extrapolation du procédé de production de la lipase. En effet, par comparaison avec les autres facteurs physico-chimiques (pH, qualité de dispersion du substrat hydrophobe), les limitations en oxygène dissous se sont avérées avoir un impact significatif sur la production de lipases extracellulaires, ainsi que sur le niveau d'induction du gène *lip2*.
- Etude fondamentale de l'impact du transfert d'oxygène lors des différentes étapes de production de lipase (**chapitre 3**). Une étude approfondie de la fluctuation du transfert d'oxygène a permis d'estimer son impact sur trois processus physiologiques clés intervenant au niveau de la synthèse de la lipase : l'expression du gène *lip2* codant pour la lipase, la traduction des ARNm en protéines et l'excrétion de la lipase. Cette étape a permis de confirmer l'effet des fluctuations en oxygène dissous sur l'activation du gène *lip2* et sur la quantité d'ARNm correspondant.
- L'optimisation du transfert d'oxygène en intégrant une stratégie antimousse (**chapitre 4**). Dans un cadre d'amélioration du transfert d'oxygène, un système antimousse a été étudié en utilisant deux approches, une chimique et l'autre physique. Dans un second



temps, un procédé d'enrichissement du flux d'air en oxygène a été mis en place afin de réduire le débit de gaz et limiter la formation de mousse tout en maintenant un taux de transfert d'oxygène suffisant. L'approche basée sur la stratégie anti-mousse mécanique s'est révélée inefficace dans le cadre de la production de lipase. En effet, celle-ci implique une couche de mousse persistante à la surface du bioréacteur dans laquelle des cellules sont soumises à des conditions hétérogènes. Des analyses menées en cytométrie en flux ont montré la ségrégation des cellules avec une sous-population présentant des tailles de cellules plus importantes. Ce phénomène peut être lié au dimorphisme, celui-ci étant supposé avoir un impact négatif sur la production de lipase. Malgré une modification des propriétés physico-chimiques du milieu de culture, l'approche antimousse chimique s'est avérée la plus efficace. Combinée à un enrichissement du flux d'air en oxygène, cette méthode permet de maintenir une concentration suffisante en oxygène dissous dans le milieu tout en limitant la formation de mouss.

- Intégration des données obtenue pour la conception d'un réacteur optimisé pour la production de lipase : essais en réacteurs *scale-down* avec antimousse chimique et enrichissement en oxygène de l'air, extrapolation de la production dans un bioréacteur de 500 L et détermination du temps de réponse au niveau de l'ARNm en condition de stress. (**chapitre 5**). Cette étape clé a permis de dresser les potentialités d'extrapolation du procédé optimisé au niveau des performances du transfert d'oxygène et antimousse. De manière surprenante, des tests réalisés en réacteurs *scale-down* partitionnés (pour rappel, un réacteur *scale-down* est un réacteur de laboratoire permettant de reproduire des défauts d'écoulement et de transfert observés dans les réacteurs industriels) ont montré une diminution significative de la formation de mousse, toute autre condition étant maintenue. Ce phénomène a été confirmé par un

test pilote réalisé dans un bioréacteur de 500L. Ce résultat original ouvre la voie pour la conception de nouveaux bioréacteurs basés sur la maîtrise des fluctuations extracellulaires. Cet aspect sera détaillé dans le paragraphe reprenant les perspectives de ce travail.

## Discussion et conclusions générales

Dans le domaine des bio-industries, le succès du développement d'un produit enzymatique commercial se fait à partir des résultats de recherches menées au laboratoire. L'étude en bioréacteurs de laboratoire permet de définir les conditions optimales de production. Ces conditions sont ensuite transposées à l'échelle industrielle en suivant des règles d'extrapolation qui ne sont actuellement pas bien définie et nécessite une étude au cas par cas (Junker, 2004; Palomares, 2010). L'extrapolation du procédé est néanmoins indispensable afin d'assurer la rentabilité économique des processus. Lors de la montée en échelle, il est important de s'attendre à une perte globale d'efficacité hydrodynamique. Dans les bioréacteurs industriels, cette perte d'efficacité hydrodynamique se traduit par l'apparition de gradients de concentration qui soumettent les cellules microbiennes à des fluctuations environnementales (Lara, 2006). De manière générale, la dynamique de réponse microbienne face à ces fluctuations (décrit dans la littérature sous le terme *stress response*) est encore mal caractérisée (Enfors, 2001). Ce fait peut être attribué à la complexité des systèmes biologiques et à leur capacité de réponse dépendant de plusieurs niveaux de régulation (métabolique, protéomique et génomique). Parmi les procédés de production des enzymes microbiennes, le procédé relatif à la lipase a été bien étudié et optimisé au niveau du laboratoire (Destain, 2005; Destain J., 1997; Fickers, Nicaud, Gaillardin, Destain, & Thonart, 2004; Fickers P., 2005; Turki, 2010). Cependant, l'impact des fluctuations environnementales lors de l'extrapolation du procédé n'a jamais été étudié.

Dans ce contexte, le présent travail de thèse s'est attaché à délivrer les bases scientifiques et techniques de l'étude de l'extrapolation de la production de la lipase. Cette étude s'est basée expérimentalement sur une approche *scale-down* du processus en relation avec plusieurs paramètres physiologiques clés relatifs à la production de lipase. Cette approche *scale-down* permet de reproduire à l'échelle du laboratoire des défauts hydrodynamiques caractéristiques des bioréacteurs industriels.

À l'issue de ce travail, nous avons observé l'effet du bioréacteur *scale-down* sur la production de lipase par *Yarrowia lipolytica* en mode de production *batch*. L'augmentation du volume réactionnel rend le mélange du milieu plus difficile et entraîne la formation de gradients de concentrations en oxygène dissous, une dispersion liquide-liquide hétérogène (le procédé est basé sur l'utilisation d'une source de carbone hydrophobe) et la fluctuation du pH.

L'état physiologique de *Y.lipolytica* en fonction des perturbations générées au niveau des bioréacteurs *scale-down* a été observé sur base de trois niveaux physiologiques distincts: la croissance cellulaire et l'activité lipase extracellulaire (facteurs globaux de la dynamique du procédé) et la production de lipase au niveau intracellulaire (mesuré par l'utilisation de la souche JMY775 avec un gène rapporteur *LacZ* et contrôlé par promoteur *lip2*).

Notre étude a clairement identifié les fluctuations en oxygène dissous comme facteur limitant l'extrapolation du procédé. Cette observation a été effectuée à partir de culture de *Y. lipolytica* réalisées en bioréacteurs *scale-down*. Ces bioréacteurs ont été dimensionnés de manière à exposer les cellules microbiennes à des fluctuations en oxygène dissous de fréquence et d'amplitude contrôlées. Les fluctuations à faible fréquence affectent le rendement global du procédé en terme de quantité finale de lipase produite, mais la production spécifique de lipase n'est pas affectée (c'est-à-dire le nombre d'unités de lipase par gramme de cellules microbiennes). A l'inverse, quand la fréquence de fluctuation en oxygène dissous diminue (c'est-à-dire quand la période d'exposition des cellules

microbiennes à une limitation en oxygène augmente), le rendement spécifique de lipase chute, ce qui signifie que la physiologie interne de la cellule est affectée. Cette observation a été validée par un système de gène rapporteur basé sur le promoteur *lip2* (Kar, 2008). Plusieurs auteurs ont mentionné que l'intensification du transfert d'oxygène contribue de manière significative à l'amélioration de la production de lipase (Chen, Wen, & Chen, 1999; Elibol & Ozer, 2000; Lee & Rhee, 1993; Lopes et al., 2008), mais aucune étude n'avait été menée jusqu'à ce jour pour estimer l'impact physiologique de l'exposition prolongée des cellules à une limitation en oxygène dissous. A cette fin, la sensibilité du système *lip2* par rapport aux fluctuations de concentration en oxygène dissous a ensuite été étudiée plus en détail en analysant le nombre d'ARN messagers *lip2* transcrits. Les cellules microbiennes ont été soumises à des cycles de fluctuations en oxygène dissous dans des réacteurs *scale-down* dédiés. Ces expériences ont permis de montrer que le système *lip2* est affecté pour des périodes de limitation en oxygène de l'ordre de 200 secondes, ce qui est bien en accord avec le temps moyen de synthèse des ARNm (Lara, 2005). Ces résultats sont en relation directe avec les valeurs des temps de demi-vie et de synthèse des ARNm (environ 10 à 100 secondes pour la synthèse et environ 1 à 3 min de la dégradation) par rapport à l'amplitude des fluctuations de l'oxygène dissous. Il est cependant difficile d'analyser la réponse immédiate du stress au niveau protéique (telle que la  $\beta$ -galactosidase utilisée dans ce travail comme système rapporteur de la synthèse de lipase au niveau intracellulaire) car ces systèmes présentent une dynamique beaucoup plus lente que celle des ARNm. La quantification du contenu intracellulaire en protéine rapporteur permet néanmoins d'estimer les effets cumulés et à long terme de l'exposition des cellules aux hétérogénéités de mélange (Delvigne, 2009).

Nous avons donc montré que les performances de transfert d'oxygène du réacteur affectent la physiologie de *Y. lipolytica* sur plusieurs niveaux, en fonction des amplitudes et des fréquences de limitation en oxygène auxquelles sont soumises les cellules microbiennes. Un

problème technologique majeur rencontré lors de ce travail est la formation de mousse. Ce phénomène limite l'intensification du procédé et un travail d'optimisation du transfert d'oxygène par rapport à l'intensité de formation de mousse s'est avéré nécessaire. Les stratégies de contrôle de la mousse par voie chimique et par voie mécanique ont toutes deux été testées (Delvigne, 2010). La voie mécanique, basée sur le système SAFD (*Stirring As Foam Disruption*), a été écartée du fait de ses performances limitées dans le cadre de notre procédé de production de lipase. Le système SAFD utilisé a de plus montré une tendance à induire le phénomène de dimorphisme du fait de la présence d'une couche persistante de mousse dans laquelle sont retenues les cellules. L'impact du dimorphisme de *Y. lipolytica* sur la production de lipase n'est pas encore bien caractérisé, mais pourrait avoir des conséquences néfastes, ce qui expliquerait les faibles rendements observés pour les réacteurs conduits avec une régulation SAFD (Ruiz-Herrera, 2002). Ce type de réacteur pourrait constituer une bonne base pour l'étude de l'effet du dimorphisme sur la production de lipase par *Y. lipolytica*.

Le système de contrôle chimique de la mousse a donc été retenu et a été couplé dans un second temps avec une régulation de l'oxygène dissous sur base de la composition de l'air entrant. A même débit d'aération, ce système de contrôle basé sur l'enrichissement progressif de l'air d'entrée en oxygène a permis d'intensifier de manière significative le transfert d'oxygène (maintien de la concentration en oxygène dissous à un niveau non limitant pour toute la durée de la culture) tout en gardant une même intensité de formation de mousse (celle-ci étant reflétée par la consommation en agent antimousse lors de la culture). L'extrapolation du procédé a ensuite été envisagée sur base de ce système combiné antimousse chimique / enrichissement de l'air. De manière surprenante, les expériences ont révélés que le phénomène de moussage était fortement limité, même pour les périodes de fluctuations en oxygène dissous n'affectant pas la physiologie du procédé (c'est-à-dire

inférieure à 100 secondes). Ce résultat hautement intéressant a été validé à une échelle de bioréacteur de 500L.

Ce travail a donc permis d'identifier les facteurs physico-chimiques clés pour l'optimisation de réacteurs submergés pour la production de lipases. A l'heure actuelle, deux technologies ont été investiguées dans le cadre de la production de lipase : la fermentation dite submergée qui a été utilisée dans le cadre de ce travail et la fermentation semi-solide. Cette dernière technologie met en œuvre un substrat solide humidifié sur lequel des micro-organismes de types moisissures (seuls quelques rares cas de fermentation semi-solide mettant en œuvre des bactéries ou des levures sont mentionnés dans la littérature (Treichel, 2010)) peuvent se développer. Cette technologie est utilisée de manière générale afin de produire des enzymes microbiennes à partir de sous-produits solides d'origine agricole. On remarque cependant une faible utilisation de la technologie de culture semi-solide par rapport à la culture submergée. Cela est dû au fait que les réacteurs semi-solides ont fait l'objet de peu de développement par rapport aux réacteurs en phase liquide (difficulté de manipuler des substrats solides et la biomasse microbienne qui s'y développe en surface, manque de capteurs en ligne et de systèmes de contrôle adaptés). Néanmoins, ceux-ci possèdent des particularités qui peuvent être mieux exploitées au vu des résultats acquis au cours de cette étude. Celles-ci seront discutées dans le paragraphe suivant présentant les perspectives du travail.

## Perspectives

Les perspectives de ce travail ont trait à la manière dont est effectuée à l'heure actuelle l'extrapolation des bioréacteurs pour la production d'enzymes. En effet, les règles d'extrapolation actuelles reposent presque entièrement sur des paramètres physico-chimiques, telle que la puissance dissipée, le nombre de Reynolds ou encore le taux de transfert d'oxygène (Junker, 2004; Nienow A.W., 1998). Le manque de perfectionnement de cette méthodologie d'extrapolation peut être expliqué par l'origine de la conception des bioréacteurs. En effet, ceux-ci ont été conçus sur base des réacteurs mécaniquement agités fréquemment mis en œuvre dans l'industrie chimique. Cette analogie s'est limitée aux aspects mécaniques et n'a pas intégré les contraintes physiologiques dues à l'utilisation d'un système biologique tel que celui constitué par une population microbienne. Un bon exemple de cette complexité biologique a été abordé dans ce travail avec un système pouvant répondre à plusieurs niveaux (croissance cellulaire et production d'enzymes globales, activation du gène *lip2*, excrétion de l'enzyme) face aux fluctuations environnementales imposées par l'extrapolation du volume de culture. Du point de vue physique, la clé pour l'optimisation du procédé consiste à trouver le bon rapport de paramètres de performances conduisant à une maximisation du transfert d'oxygène tout en limitant la formation de mousse. Selon les principes classiques (reposant sur des paramètres physiques uniquement), les règles d'extrapolation prédisent une augmentation de l'intensité de formation de mousse avec l'augmentation du volume réactionnel, tous les autres paramètres opératoires étant maintenus constants. Or, nos résultats ont montré une réduction drastique du phénomène de moussage lors de l'extrapolation du procédé (simulé par des tests en réacteurs *scale-down* et validé en bioréacteur pilote de 500L).

Cette observation nous mène à conclure que la présence d'hétérogénéité dans le volume réactionnel ne doit pas être forcément considéré comme un facteur négatif. D'autres auteurs

ont montrés une amélioration de la viabilité cellulaire dans des réacteurs hétérogènes par rapport à des réacteurs de laboratoire considérés comme bien mélangés (Hewitt, 2007). Cette observation peut être expliquée par l'acquisition d'avantages physiologiques (par exemple, accumulation de protéines de réponse au stress) par les cellules microbiennes soumises à des fluctuations environnementales.

Une perspective intéressante de ce travail serait donc de trouver les amplitudes et fréquences optimales de fluctuations en oxygène dissous conduisant à une réduction du phénomène de moussage (phénomène technologique majeur pour les bioprocédés (Delvigne, 2010; Junker, 2007)) tout en maintenant une productivité de lipase maximale. Cette stratégie a déjà été abordée de manière très ponctuelle pour optimiser le nombre de copies de plasmide dans un procédé de production de protéines recombinantes (Patnaik, 2002).

Cette implémentation des connaissances pourrait être réalisée au niveau d'une nouvelle génération de bioréacteur connue sous le nom de réacteur à biofilm (Rosche, 2009). Jusqu'à aujourd'hui, les biofilms ont été utilisés dans le domaine environnemental, mais ceux-ci commencent à être développés dans le cadre de la production de métabolites (alcools, acides organiques, enzymes,...) à partir de culture pure de micro-organismes (Cheng, 2010). Dans ces réacteurs, le système d'agitation est remplacé par un garnissage structuré en acier inoxydable sur lequel le milieu de culture s'écoule et est mis en contact avec l'air. Dans le cas de *Y. lipolytica* cette technologie pourrait être avantageusement employée afin de limiter la formation de mousse, le transfert d'oxygène se basant ici sur un contact entre le milieu de culture s'écoulant sous forme de film à la surface du garnissage et l'air circulant à contre-courant. De cette manière, il n'est pas nécessaire de disperser l'air sous forme de fines bulles au sein de milieu réactionnel, ce qui permet d'éliminer le vecteur principal de la formation de mousse rencontré en culture submergée. Des précautions devront toutefois être prises afin d'observer l'apparition du phénomène de dimorphisme et son impact sur les rendements en



lipase. Il faut toutefois garder à l'esprit que ce type de réacteur mettant en œuvre l'écoulement du milieu de culture sur des surfaces fixes favorise la formation de biofilm. Généralement, ce développement sous forme de biofilm est reconnu comme un avantage permettant aux micro-organismes de se développer sous une forme plus résistante au stress relatif au procédé (Rosche, 2009). Dans le cas de *Y. lipolytica*, la formation de biofilm pourrait être liée au dimorphisme cellulaire se traduisant par une diminution des rendements en lipase. Un second avantage de ce type de réacteur est que le temps de séjour des micro-organismes dans le film liquide s'écoulant à la surface du garnissage peut être contrôlé. Les résultats acquis au niveau de ce travail ont montré que les hétérogénéités spatiales au sein du réacteur pouvaient avoir un effet bénéfique sur le procédé, pour autant que ces hétérogénéités puissent être maintenues dans une gamme d'amplitude et de fréquence donnée (en relation avec la synthèse des ARNm et des protéines correspondantes). La mise en place d'un réacteur type « biofilm » à garnissage permettrait d'exploiter les fluctuations environnementales dans une gamme d'amplitude et de fréquence contrôlée, par rapport aux réacteurs submergés classiques qui présentent une dispersion très importante au niveau de ces paramètres (ce qui constitue à l'heure actuelle le problème principale pour l'extrapolation des bioréacteurs classiques à agitation mécanique). Des tests sont d'ores et déjà menés dans notre laboratoire afin d'estimer les performances des réacteurs à biofilm dans le cadre de la culture de plusieurs types de micro-organismes et des métabolites correspondants.

## Références

- Chen, J.-Y., Wen, C.-M., & Chen, T.-L. 1999. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnology and bioengineering*, 62(3): 311-316.
- Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmarck, J.M.,. 2010. Advances in biofilm reactors for production of value-added products. *Applied microbiology and biotechnology*, 87: 445-456.
- Delvigne, F., Boxus, M., Ingels, S., Thonart, P.,. 2009. Bioreactor mixing efficiency modulates the activity of a *prpoS::GFP* reporter gene in *E. coli*. *Microbial cell factories*, 8: 15.
- Delvigne, F., Lecomte, J.P.,. 2010. Foam formation and control in bioreactors, *Encyclopedia on industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technologies*: in press: Wiley.
- Destain, J., Fickers, P., Weeckers, F., Moreau, B., Thonart, P.,. 2005. Utilization of methylcelate in production of microbial lipase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 121-124: 269-278.
- Destain J., R. D., Thonart P. 1997. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology letters*, 19(2): 105-107.
- Elibol, M., & Ozer, D. 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 36(4): 325-329.
- Enfors, S. O., Jahic, M., Rozkov, A., Xu, B., Hecker, M., Jürgen, B., Krüger, E., Schweder, T., Hamer, G., O'Beirne, D., Noisommit-Rizzi, N., Reuss, M., Boone, L., Hewitt, C., McFarlane, C., Nienow, A., Kovacs, T., Trägårdh, C., Fuchs, L., Revstedt, J., Friberg, P.C., Hjertager, B., Blomsten, G., Skogman, H., Hjort, S., Hoeks, F., Lin, H.Y., Neubauer, P., van der Lans, R., Luyben, K., Vrabel, P., Manelius, A. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of biotechnology*, 85: 175-185.
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J., & Thonart, P. 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4): 742-749.
- Fickers P., F. F., Nicaud JM, Destain J., Thonart P. 2005. Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of biotechnology*, 115: 379-386.
- Hewitt, C. J., Nienow, A.W.,. 2007. The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes, *Advances in applied microbiology*: 105-135: Vol. 62.
- Junker, B. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97(6): 347-364.
- Junker, B. 2007. Foam and Its Mitigation in Fermentation Systems. *Biotechnology progress*, 23: 767-784.
- Kar, T., Delvigne, F., Masson, M., Destain, J., Thonart, P.,. 2008. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 35: 1053-1059.
- Lara, A. R., Galindo, E., Ramirez, O.T., Palomares, L.A.,. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors - Understanding the effects of environmental gradients on cells. *Molecular biotechnology*, 34: 355-381.
- Lara, A. R., Leal, L., Flores, N., Gosset, G., Bolivar, F., Ramirez, O.T.,. 2005. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen

- tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnology and bioengineering*, 93(2): 372-385.
- Lee, S. Y., & Rhee, J. S. 1993. Production and Partial-Purification of a Lipase from *Pseudomonas-Putida* 3sk. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(7): 617-623.
- Lopes, M., Gomes, N., Gonçalves, C., Coelho, M. A. Z., Mota, M., & Belo, I. 2008. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 255-260.
- Nienow A.W. 1998. Hydrodynamics of stirred bioreactors. *Applied mechanics review*, 51(1): 3-32.
- Palomares, L. A., Ramirez, O.T., 2010. Geometric considerations for bioreactor scale-up. In Wiley (Ed.), *Encyclopedia of industrial biotechnology : bioprocess, bioseparation and cell technology*.
- Patnaik, P. R. 2002. Can imperfections help to improve bioreactor performance ? *Trends in biotechnology*, 20(4): 135-137.
- Rosche, B., Li, X.Z., Hauer, B., Schmid, A., Buehler, K.,. 2009. Microbial biofilms : a concept for industrial catalysis ? *Trends in biotechnology*, 27(11): 636-643.
- Ruiz-Herrera, J., Sentandreu, R.,. 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives in microbiology*, 178: 477-483.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M., Oliveira, J.V.,. 2010. A review on microbial lipases production. *Food and bioprocess technology*, 3: 182-196.
- Turki, S., Ayed, A., Chalgoumi, N., Weekers, F., Thonart, P., Kallel, H.,. 2010. An enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(5).